



TITLE:

# マウス卵管上皮の形態形成において平面内細胞極性因子が果たす役割(Digest\_要約)

AUTHOR(S):

石, 東博

---

CITATION:

石, 東博. マウス卵管上皮の形態形成において平面内細胞極性因子が果たす役割. 京都大学, 2014, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2014-11-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18666>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2015/11/24に公開; 許諾条件により要旨は2015/02/24に公開

マウス卵管上皮の形態形成において  
平面内細胞極性因子が果たす役割  
【要約】

石 東博



## 要旨

動物の器官は多様な機能を果たすべく巧妙に3次元空間に形作られており、その形態形成のメカニズムは興味深い。本論文で私はマウスの卵管を用いて、その機構の一端を明らかにした。

卵管は卵巣と子宮をつなぐ管で、哺乳類では卵巣から排卵された卵が卵管を通して子宮へと運ばれる。卵管上皮には多くの繊毛細胞があり、いずれの繊毛も卵巣から子宮への分泌液の流れを作り出すべく非対称な繊毛運動を行う。また、卵管上皮は卵管内腔にせり出して立体的なヒダ構造をとり、これらのヒダ構造は卵巣－子宮軸に平行に配向する。これらの観点から、マウス卵管は様々な規模の極性を有する器官と言えるが、その極性の形成機構は未解明だった。

私はまず、マウス卵管上皮の繊毛運動に着目して繊毛運動周波数を測定すると共に、卵管上皮の繊毛運動のみによっても卵丘・卵母細胞複合体が子宮側へ輸送されることを観察した。これらにより、極性をもった繊毛運動が卵の輸送において重要な役割を果たすことが示された。

卵管上皮の繊毛運動のように、上皮細胞が上皮シート内の一定の軸に沿って発達させる極性のことを平面内細胞極性 (Planar cell polarity; PCP) と呼ぶ。私は種を越えて保存されている PCP 調節タンパク質に着目し、卵管上皮の形態形成における役割を解析した。PCP 調節タンパク質の中のいくつかは、細胞極性形成に先立って、細胞内で非対称な局在をすることが知られている。その一つである7回膜貫通型カドヘリンのマウスホモログ *Celsr1* タンパク質の局在を調べたところ、*Celsr1* タンパク質は、卵管上皮細胞において繊毛形成に先行して卵巣－子宮軸に垂直な細胞境界上に強く集積することが分かった。

そこで、*Celsr1* 遺伝子を欠損したマウスの卵管を観察したところ、繊毛運動の方向が乱れ、卵の輸送能も損なわれていた。また、卵管上皮のヒダは形成されたものの、卵巣－子宮軸に沿って配向しておらず、異常な分岐も見られた。さらに、個々の細胞頂端面の形状にも異常を検出した。野生型の卵管上皮では、細胞の頂端面はヒダに沿って伸長していることを見出したが、*Celsr1* 変異マウスでは細胞が伸長せずにより丸い形態を示し、細胞の長軸方向もヒダに沿っていなかった。

以上のように、*Celsr1* が卵管上皮の個々の細胞の伸長方向から、平面内の繊毛運動の方向、そして3次元のヒダ形成に至るまでの、多階層の極性形成に必要なことが分かった。そこで、*Celsr1* がどのようにこれらの極性形成を制御しているかを調べるために、*Celsr1* 変異細胞を用いたモザイク解析を行った。その結果、細胞頂端面の形態の極性が、ヒダ構造の形態の極性に比べ、より直接的に *Celsr1* により制御されていることが示唆された。

## 略語表

ACF	Auto Correlation Function/自己相関関数
bf	Basal Foot
CBF	Ciliary Beat Frequency/繊毛運動周波数
CCD	Charge Coupled Device/電荷結合素子
COC	Cumulus Oocyte Complex/卵丘・卵母細胞複合体
Dgo	Diego (タンパク質名)
Ds/Dchs	Dachsous (タンパク質名)
Dsh/Dvl	Dishevelled (タンパク質名)
ECM	Extra Cellular Matrix/細胞外基質
FFT	Fast Fourier Transform/高速フーリエ変換
Fmi	Flamingo (タンパク質名)
Fz	Frizzled (タンパク質名)
OD	Optical Density/光学密度
PBS	Phosphate Buffered Saline/リン酸緩衝生理食塩水
PCP	Planar Cell Polarity/平面内細胞極性
Pk	Prickle (タンパク質名)
ROI	Region Of Interest/関心領域
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction/逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
TEM	Transmission Electron Microscopy/透過型電子顕微鏡
Vang	Van Gogh (タンパク質名)
Vangl	Van Gogh like (タンパク質名)

# 目次

<b>第 1 章</b>	<b>序論</b>	<b>1</b>
1.1	平面内細胞極性 (PCP) . . . . .	1
1.1.1	PCP 因子と PCP 形成機構 . . . . .	1
1.1.2	マウスにおける PCP . . . . .	5
1.1.3	運動性多繊毛細胞の繊毛形成と PCP . . . . .	6
1.1.4	7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo / Celsr . . . . .	6
1.2	マウスの卵管 . . . . .	8
1.2.1	卵管の構造 . . . . .	8
1.2.2	マウス卵管の発生 . . . . .	12
1.2.3	卵管上皮の繊毛運動周波数 . . . . .	12
1.3	上皮組織の突出を引き起こす力学的要因 . . . . .	15
1.4	本研究の目的 . . . . .	15
<b>第 2 章</b>	<b>マウス卵管上皮の繊毛運動</b>	<b>18</b>
2.1	結果 . . . . .	18
2.1.1	卵管上皮の高速度カメラによる観察 . . . . .	18
2.1.2	自己相関関数を用いた繊毛運動周波数の測定 . . . . .	18
2.1.3	卵管上皮の繊毛運動周波数 . . . . .	20
2.1.4	繊毛による卵の輸送 . . . . .	20
2.2	考察 . . . . .	22
<b>第 3 章</b>	<b>マウス卵管上皮の形態形成における PCP 因子の役割</b>	<b>26</b>
3.1	結果 . . . . .	26
3.1.1	Celsr1 タンパク質の細胞内局在の偏りは繊毛形成前に起こる . . . . .	26
3.1.2	Celsr1 は卵管上皮の繊毛運動の方向性の協調に必須である . . . . .	31
3.1.3	Celsr1 欠損は卵管上皮の形態形成に異常を引き起こす . . . . .	32
3.1.4	Celsr1 変異体では細胞形態の極性が損なわれる . . . . .	34
3.1.5	Celsr1 によって直接的に制御される細胞形態 . . . . .	36
3.2	考察 . . . . .	36
3.2.1	卵管上皮の多階層にわたる極性 . . . . .	36
3.2.2	PCP 非依存的に局所的に繊毛の極性をそろえる機構 . . . . .	38
3.2.3	細胞形態の制御機構 . . . . .	38

3.2.4	三次元上皮形態の制御機構 . . . . .	40
<b>第4章</b>	<b>材料と方法</b>	<b>42</b>
4.1	動物 . . . . .	42
4.1.1	変異マウス . . . . .	42
4.1.2	過排卵 . . . . .	42
4.1.3	性周期の判別 . . . . .	42
4.2	モザイク解析 . . . . .	43
4.2.1	ES細胞株の樹立 . . . . .	43
4.2.2	キメラマウスの作出 . . . . .	43
4.3	CBF解析と卵の輸送 . . . . .	43
4.3.1	組織学的準備とCBF解析のための画像取得 . . . . .	43
4.3.2	画像処理とCBF測定 . . . . .	44
4.3.3	卵管による卵の輸送 . . . . .	44
4.4	野生型と <i>Celsr1</i> 変異マウスの卵管上皮の繊毛運動の観察 . . . . .	44
4.5	野生型と <i>Celsr1</i> 変異マウスの卵管によるビーズの輸送 . . . . .	45
4.6	電子顕微鏡観察 . . . . .	45
4.6.1	basal foot の方向の統計解析 . . . . .	45
4.7	膜タンパク質の細胞境界上での分布の偏りの定量化 . . . . .	45
4.8	免疫染色 . . . . .	46
4.9	細胞形態の定量化 . . . . .	48
4.10	分子生物学的手法 . . . . .	48
4.10.1	RT-PCR . . . . .	48
4.11	ソフトウェア . . . . .	49
	<b>参考文献</b>	<b>51</b>
	<b>謝辞</b>	<b>61</b>

# 第1章 序論

## 1.1 平面内細胞極性 (PCP)

多細胞生物では、組織や器官はそれぞれの機能を果たすために、複雑で巧みな形態をとる。このような組織や器官の形態形成において、方向性の情報は重要であり、各細胞の方向性を組織レベルで制御する仕組みの一つが、平面内細胞極性 (PCP; Planar Cell Polarity) である (図 1.1A)。

上皮組織には、外気や液体にさらされる頂端面と、結合組織に接着する基底面がある (図 1.1B)。個々の上皮細胞は頂端面と基底面で異なった細胞外環境に接しており、非対称である。隣り合う上皮細胞は様々な細胞間結合でつながれており、これにより細胞間隙を分子が通るのを防ぐなどの機能的な役割を果たしている。この頂端面-基底面方向とは直行した上皮平面上に発達する極性を PCP と呼ぶ。頂端面-基底面方向の極性とは違い、PCP は細胞集団の見かけ上均質な空間の中で形成される。このような PCP は、脊椎動物の上皮細胞の運動性繊毛 (図 1.1C) や、昆虫の上皮性のクチクラ突起 (図 1.1D) など多くの組織と動物で見られる (1-5)。

### 1.1.1 PCP 因子と PCP 形成機構

ショウジョウバエをモデル動物とした分子遺伝学的手法により、PCP 形成に必要な遺伝子が多く同定された (表 1.1) (1,9,10)。野生型のショウジョウバエの翅においては、各々の上皮細胞は翅全体の遠近軸に沿って、細胞遠位端に翅毛と呼ばれる突起を形成する (図 1.2A, B)。しかし、これらの遺伝子を欠損すると翅毛の伸長方向が乱れ、平面内での細胞極性の方向が統一されなくなる (図 1.2C)。Tree らはこれらの PCP に関連する PCP 因子を 3 つのモジュールにクラス分けし PCP 形成機構を説明しようと試みた (図 1.3A) (9,11)。

**Global モジュール** Global モジュールでは、組織の軸情報に沿った転写活性勾配によって、特定の遺伝子発現が調節されているとし、その情報を読み取って、細胞内の非対称なタンパク質の局在を生み出すと考えられている。Global モジュールに属す遺伝子の変異体では、各々の細胞は極性を持ち、隣接する細胞とも極性の方向を協調することができるが、その極性が組織の軸としばしば合わない (図 1.3B 下段)。Global モジュールに属す Dachous (Ds) は、翅上皮において近位側から遠位側にかけて発現勾配があり、一方 Four-jointed (Fj) はそれとは逆に遠位側から近位側にかけて発現勾配をもつ (図 1.3B 上段) (13)。Fj は Ds と Fat (Ft) の細胞外ドメインをリン酸化し両者の結合を調節するとされており、また Ds によって Ft の細胞内ドメインのリン酸化が調節されると考えられている (15-19)。これらの機構により、Ds や Ft の量、あるいは活性が細胞内の近位側と遠位側とで非対称になることが示唆されている。

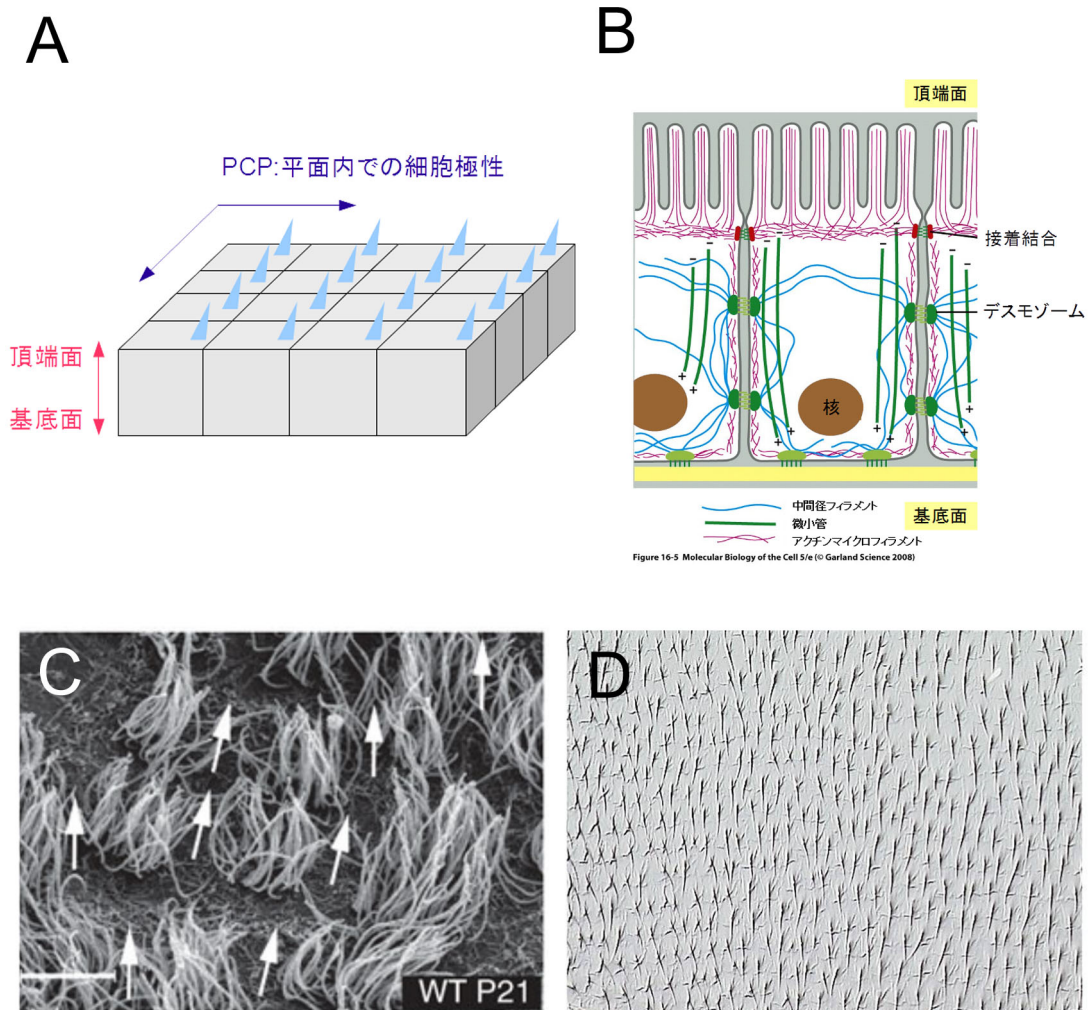


図 1.1 上皮細胞における平面内細胞極性と頂部一基部の方向性

(A) 平面内細胞極性 (PCP) の模式図。上皮細胞はシート状に連なり、頂端面一基底面軸とは直行する平面をもつ。この平面内の軸に沿って発達する細胞極性のことを PCP という。上図の例では、各上皮細胞は青色で示した突起構造を細胞の右側に持っており、平面内で突起構造の位置が示す細胞極性が揃えられていることを示す。(B) 上皮細胞の模式図。器官の表面を覆う上皮組織は、上皮の表側と裏側に異なった細胞外環境を持ち、その表一裏の方向に発達する極性を頂部一基部軸方向の極性という。(C, D) 様々な生き物で見られる PCP。(C) 生後 21 日目 (P21) のマウス脳室壁上皮細胞の運動性繊毛。矢印は繊毛が倒れている方向を示しており、細胞間で方向性がそろえられている。Bar = 5  $\mu\text{m}$  (D) ショウジョウバエ成虫腹部の側板 (pleuron)。各上皮細胞は細胞外にクチクラを分泌し、一本ずつクチクラ突起 (cuticular hair) を持ち、その先端は体軸の後方 (図の下側) を向いている。(B) は (6)、(C) は (7)、(D) は (8) よりそれぞれ引用。

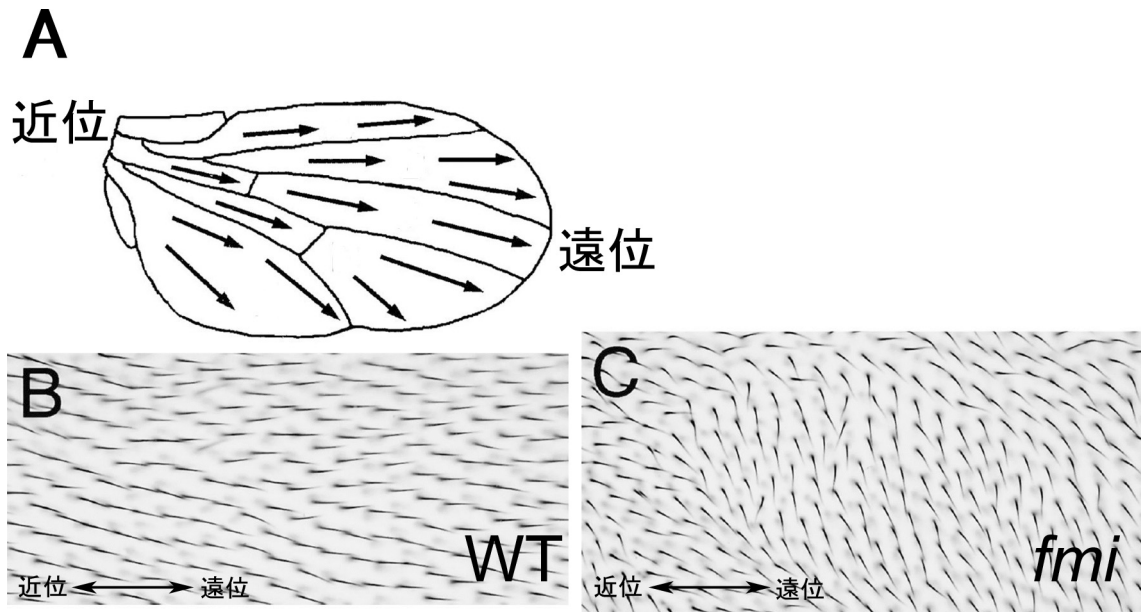


図 1.2 ショウジョウバエ翅上皮における PCP

(A, B) ショウジョウバエの翅と遠位側に伸びる野生型の翅毛の配向。(C) PCP 形成に必要な遺伝子が欠損すると翅毛の配向に異常が生じる。野生型で図の左の近位側から右の遠位側へ翅毛が向いているのに対し (B)、*fmi* 変異体ではその向きがそろっていない。

(A–C) (12) より引用。

**Core モジュール** Core モジュールでは隣接する細胞間相互作用による positive feedback によって互いの極性の方向をそろえようと考えられている。Core モジュールに属す遺伝子の変異体の代表的な表現型では、各々の細胞が極性を失い、例えば翅上皮では細胞の本来遠位側に偏って形成されるべき翅毛が中心付近に形成される (図 1.3C 上段)。また、近隣細胞との極性の協調も乱れる。Core モジュールに属すタンパク質は極性を持って細胞内で局在し、この極性が細胞の極性を定める。六角形の翅上皮で、Vang gogh (Vang)、Prickle (Pk)、Flamingo (Fmi) が近位側の二つの膜ドメインに局在し、Frizzled (Fz)、Dishevelled (Dsh)、Diego (Dgo)、Fmi が遠位側の二つの膜ドメインに局在し (図 1.3C 下段)、二つの非対称なタンパク質複合体を成す。分子メカニズムの詳細は不明であるが、細胞境界において一方のタンパク質複合体が隣接する細胞の異なるタンパク質複合体をリクルートすることなどによって、細胞間で positive feedback がおき、統一された PCP が形成されようと考えられている (図 1.3D(2, 4)) (5, 9, 10)。また、上皮細胞の頂部付近に中心体非依存的な微小管が極性を持って配向しており、この極性に沿って Fz や Fmi を含む小胞が各々の上皮細胞内において翅の遠位側に向かって選択的に輸送される (図 1.3D(3)) (14, 20)。このような極性輸送もタンパク質の非対称な局在パターン形成に関わっており、微小管の配向の極性が Fz–Ds を介する細胞間相互作用によって制御されていることから、Global モジュールと Core モジュールが関連していることも示唆されている (図 1.3D(1))。

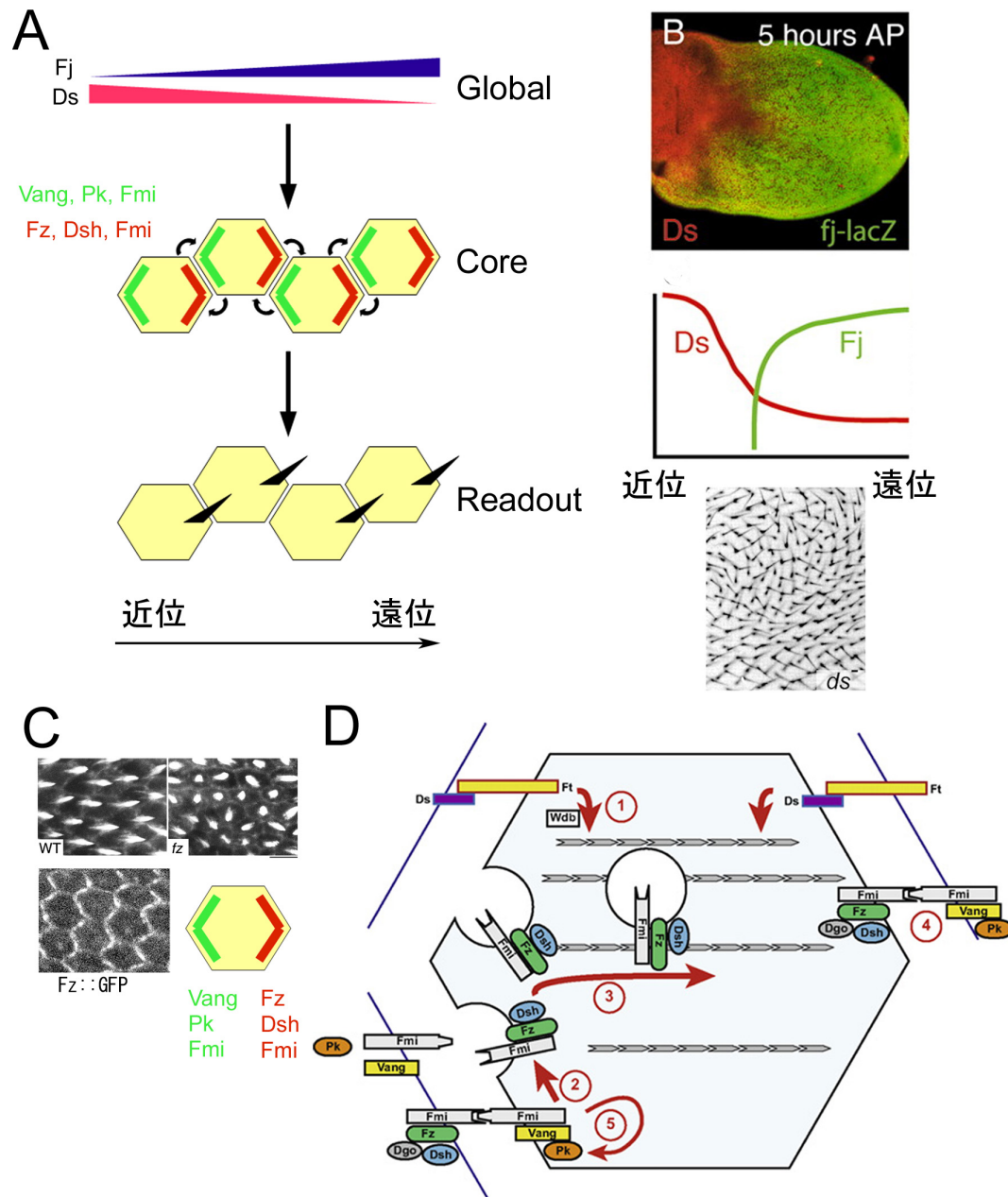


図 1.3 ショウジョウバエ翅上皮での PCP 形成機構モデル

(A) PCP 形成機構モデルと PCP 因子の 3 つのモジュール。詳細は本文参照。(B) Global モジュールに属す PCP 因子の発現パターンと変異体の表現型。翅上皮での Ds と Fj の発現 (上・中段) と *ds* 変異体の表現型 (下段)。AP : After Pupariation 蛹化後。(C) Core モジュールに属す PCP 因子の細胞内局在と変異体の表現型。*fz* の変異体の表現型 (上段)、Fz::GFP (Green Fluorescent Protein; 緑色蛍光タンパク質) の翅上皮での局在 (下段左) と PCP 因子の局在パターンの模式図 (下段右)。翅毛は GFP::Actin によって可視化されている (上段)。(D) Core モジュールに属す PCP 因子の非対称な局在の形成モデル。(1) Ft-Ds ヘテロダイマーによる微小管配向の制御。(2) 異なるタンパク質群による排他的な局在競争。(3) 非対称な微小管配向に基づく PCP 因子を含む小胞の極性輸送。(4) 細胞境界をはさんだ非対称なタンパク質複合体形成による極性の安定化。(5) エンドソームによる本来の局在とは異なる場所に誤局在した分子のリサイクル。

(B) は (13)、(C) は (14)、(D) は (9) よりそれぞれ引用。



タンパク質名		タンパク質の特徴	モジュール
ショウジョウバエ	マウスホモログ		
Fat (Ft)	Fat1-4	1 回膜貫通型の非典型的カドヘリン	Global
Dachsous (Ds)	Dachsous (Dchs)1/2	1 回膜貫通型の非典型的カドヘリン	Global
Four-jointed (Fj)	Fjx	1 回膜貫通型ゴルジキナーゼ	Global
Flamingo (Fmi)	Celsr1-3	7 回膜貫通型の非典型的カドヘリン	Core
Frizzled (Fz)	Frizzled (Fz) 3/6/7	7 回膜貫通型受容体	Core
Dishevelled (Dsh)	Dishevelled (Dvl) 1-3	マルチドメイン細胞質タンパク質	Core
Diego (Dgo)	Inversin	Ankyrin リピートを持つタンパク質	Core
Van gogh (Vang)	Van Gogh-like (Vangl) 1/2	4 回膜貫通型タンパク質	Core
Prickle (Pk)	Prickle(Pk)1/2	マルチドメイン細胞質タンパク質	Core
Rho1	RhoA	低分子量 GTP 結合タンパク質	Readout
Drok	Rok/Rock	Rho 関連キナーゼ	Readout
Inturned (In)	Inturned	膜タンパク質	Readout
Fuzzy (Fy)	Fuzzy	膜タンパク質	Readout

表 1.1 ショウジョウバエ翅上皮の PCP 形成に必要な PCP 因子の特徴

**Readout モジュール** Readout モジュールでは他のモジュールで形成されたタンパク質の局在パターンを読み取り、組織特異的に細胞内器官を極性に沿って形成すると考えられている。低分子量 GTP (Guanosine Triphosphate; グアノシン三リン酸) 結合タンパク質である Rho1 や Rho 関連キナーゼである Drok は翅上皮で各細胞の遠位側でアクチンを集積させ前翅毛 (prehair) を形成する (21,22)。また、Inturned (In) と Fuzzy (Fy) は細胞自律的に細胞の近位側に局在し、翅毛形成の場所を遠位側に制限していると考えられている (23,24)。

### 1.1.2 マウスにおける PCP

マウスにおいても多くの器官で PCP が見られ、ショウジョウバエの PCP 遺伝子のホモログが PCP 形成に役割を果たしている。例えば、内耳有毛細胞は同じ向きに不動毛を形成しているが、Core モジュールに属す遺伝子である Fz、Dvl (Dishevelled)、Vangl (Van Gogh like)、Pk、Celsr のいずれの遺伝子の変異体も不動毛の向きが揃わなくなり、一部では平衡感覚に異常が生じる (図 1.4A) (25,26)。皮膚の毛嚢細胞においても、Core モジュールに属するショウジョウバエの PCP 遺伝子のいくつかのマウスホモログのタンパク質が、ショウジョウバエで見られたような特異的な局在パターンを示し (図 1.4B) (27)、それらの変異体では毛嚢細胞の PCP が損なわれる。また、PCP 因子の変異体では、気管上皮細胞、脳室壁上皮細胞、胚のノードの細胞において、繊毛運動の極性に異常が見られることから、マウスの繊毛運動の極性の制御においても PCP 因子が必要であることが報告されている。(7,28-33)。このように PCP 因子のホモログはマウスにおいても多くの器官の PCP 形成に必要であることがわかっているが、マウスでの PCP 形成機構については未解明な部分が多い。

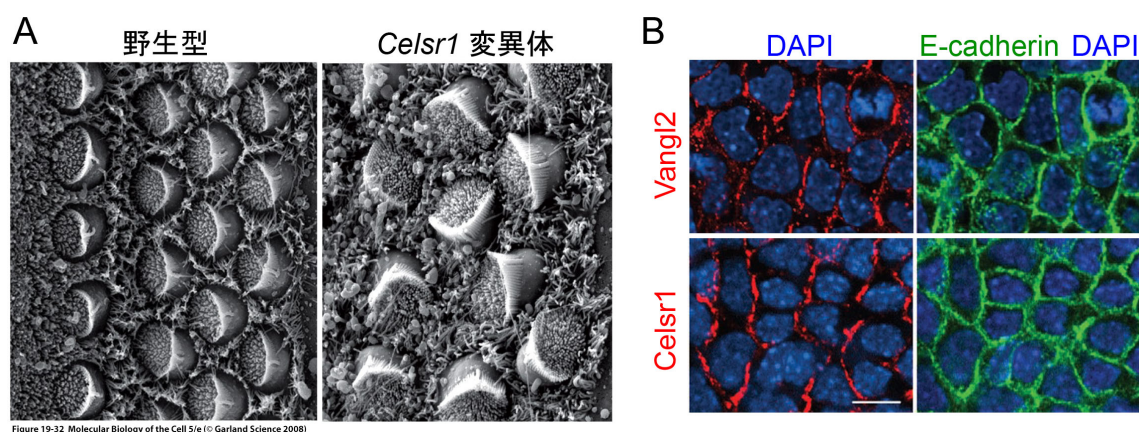


図 1.4 マウスにおける PCP の例

(A) 内耳蝸牛管の有毛細胞の配向はアクチンによって構成された不動毛の形態に現れる。野生型では各細胞の極性が揃えられているのに対し、PCP 因子 (*Celsr1*) の変異体では乱れる。(B) 皮膚の毛嚢細胞では PCP 因子 (*Celsr1*, *Vangl2*) が細胞内で非対称に局在し、上皮全体では縞模様を成す。E-cadherin 免疫染色は細胞境界、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色は核を示す。左：前側、右：後側。受精後 15.5 日目マウス胚。Bar = 10  $\mu$ m

(A) は (6,34)、(B) は (27) よりそれぞれ引用。

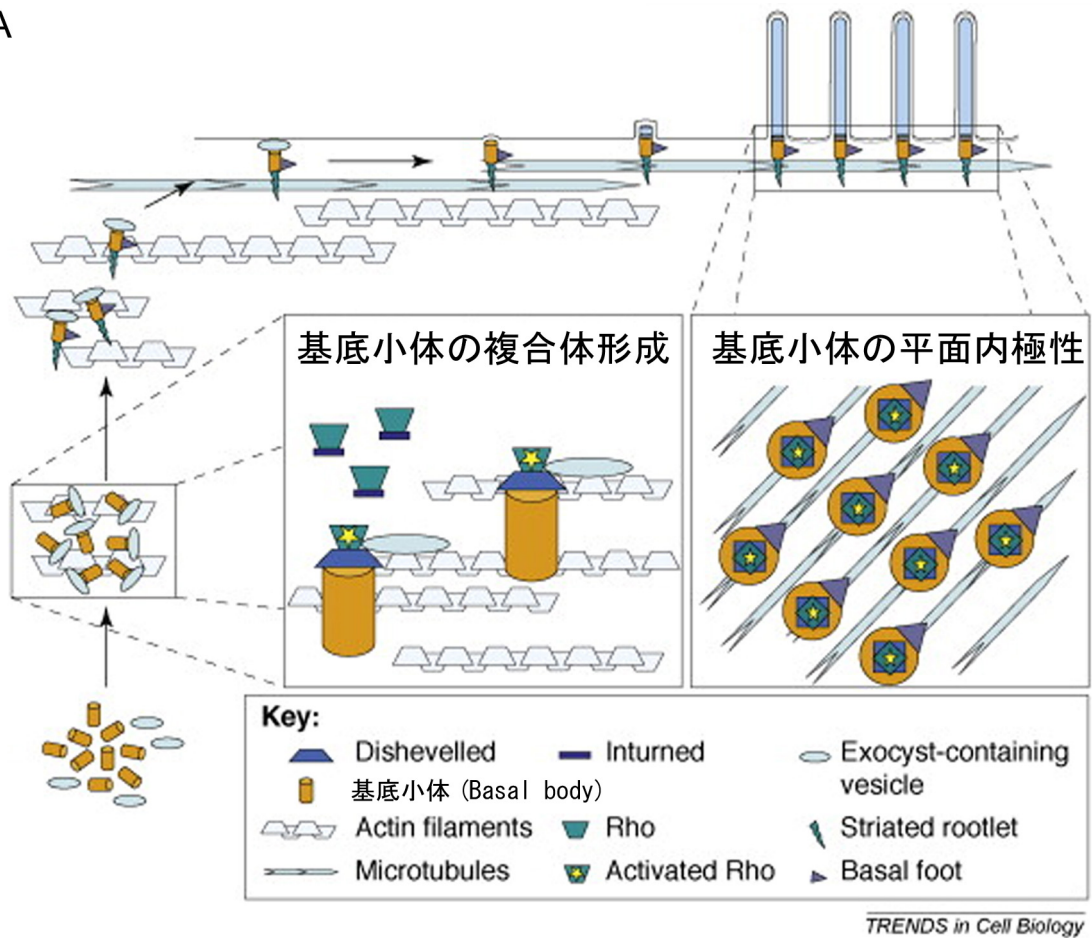
### 1.1.3 運動性多繊毛細胞の繊毛形成と PCP

気管や卵管の上皮細胞は運動性の繊毛を持ち、分泌液の流れを作ることによって異物の除去や、卵の輸送などの機能的な役割を果たす。運動性の繊毛はその根元に基底小体と呼ばれる中心体と似た構造を持ち、基底小体が上皮細胞の頂部に結合することによって繊毛形成は始まる (図 1.5A) (35,36)。結合後、繊毛が伸長されていくが、繊毛形成初期では分泌液の流れはなく、繊毛形成と共に流れが作り出されると考えられる。分泌液の流れの方向は繊毛運動の有効打の向きと一致する。繊毛運動の有効打方向は、基底小体に付属する basal foot (bf) と呼ばれる電子密度の高い構造の方向と一致しており、電子顕微鏡によって得られる超微細構造で判別することができる (37)。マウスの脳室壁上皮細胞、ツメガエルの表皮やウズラの卵管上皮において、繊毛形成初期で bf の方向性が細胞内で揃っておらず、形成が進むにつれて揃い、分泌液の流れが生まれる (図 1.5B) (30,38,39)。繊毛の有効打方向は分泌液の流れによる positive feedback (30,38) と、PCP 因子によって制御されていると考えられており、ツメガエル胚の表皮では Core モジュールの PCP 因子の機能阻害によって細胞間での繊毛運動方向が揃わなくなる (40)。また、マウス脳室壁上皮においては Core モジュールに属す *Vangl2* が細胞内で非対称な局在を示しており (図 1.5C)、PCP 因子の変異体で繊毛運動の方向が揃わなくなる (30)。これらのことから、詳細な機構は明らかになっていないが、運動性多繊毛細胞の PCP 形成にも PCP 因子が関与していることがわかっている。

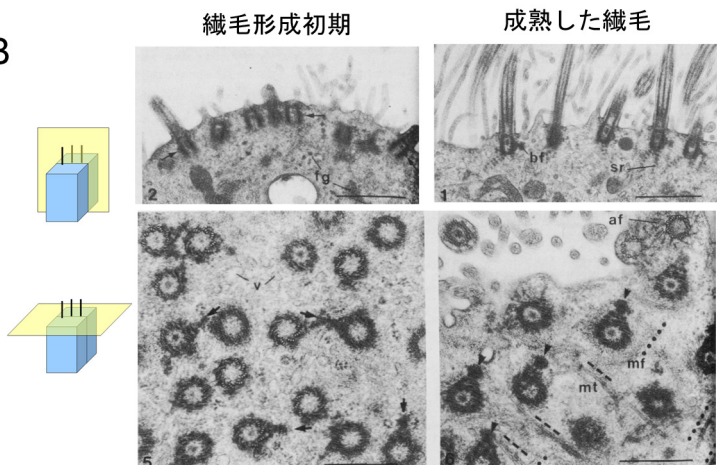
### 1.1.4 7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo / *Celsr*

Flamingo (*fmi*) は 7 回膜貫通領域をもつカドヘリンスーパーファミリーの分子として、私が所属する研究室の碓井らによって同定された分子であり (12)、starry night (*stan*) とも呼ばれている (41)。

A



B



C

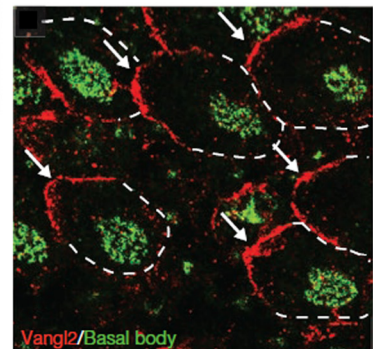


図 1.5 運動性多繊毛細胞の繊毛形成と PCP

(A) 繊毛形成の模式図。細胞質で基底小体 (Basal body) が形成され、アクチン等と複合体をつくり上皮細胞の頂端面に運ばれ結合する。その後、繊毛が伸長し、basal foot (bf) や striated rootlet (sr) といった微細構造で判断される繊毛の極性が平面内でそろそろ。 (B) ウズラの卵管上皮の繊毛の透過型電子顕微鏡像。基底小体が頂端面に結合してすぐの初期では繊毛は短く、矢じり、矢印で示された bf の向きもそろっていないが (左)、繊毛形成が進むにつれ bf の極性がそろそろ (右)。Bar = 0.80  $\mu\text{m}$  (上段)、0.37  $\mu\text{m}$  (下段)。mf: microfilament、mt: 微小管。その他の記号: 不明。 (C) マウスの脳室壁上皮で PCP 因子の一つである Vangl2 タンパク質は細胞膜上で非対称に局在する (矢印)。

(A) は (36)、(B) は (39)、(C) は (30) よりそれぞれ引用。

Fmi は PCP 因子の Core モジュールに属し、PCP を調節するほか、神経系においては軸索ガイダンス、および樹状突起のパターニング等を調節している (42–44)。PCP 因子の Core モジュールの中で、Fmi は翅上皮の近位側、遠位側の両方の膜ドメインに局在する特徴を持つ。また、細胞外ドメインを介してホモフィリックに結合することが知られている (12)。

*fmi* 相同遺伝子は哺乳類では 3 種存在し、*Celsr 1–3* (Cadherin EGF LAG seven-pass G-type Receptor) と呼ばれている (12, 45, 46)。Celsr タンパク質は約 3000 アミノ酸からなる巨大分子であり、細胞外ドメインにカドヘリンリピートを 9 個持ち、他に EGF ドメイン、ラミニン G ドメインと、7 回膜貫通レセプターのファミリーに共通した HormR (Hormone Receptor) ドメインと GPS (GPCR proteolytic site) ドメインを持つ (図 1.6)。

Celsr はマウスにおいて様々な器官の形態形成において役割を果たす。特に神経系で広く発現しており、PCP のみならず神経発生においても多くの役割を果たすことが報告されている (1, 47–49)。*Celsr1* 遺伝子に点変異 (D1040G) を持った *Celsr1<sup>Crsh</sup>* 変異マウスでは、内耳蝸牛管の有毛細胞や、皮膚の毛嚢細胞で PCP の異常があり、肺の分岐構造や、リンパ管弁の形成にも異常があることが報告されている (27, 34, 50–52)。また、他の PCP 遺伝子の変異体でも見られる神経管閉鎖異常によって、ホモ変異体は胎生致死である。一方、*Celsr1* ノックアウトマウス (*Celsr1<sup>-/-</sup>*) も作出され、約 20% が神経管閉鎖に異常が見られるものの、約 80% は正常通り発生する (50)。*Celsr1<sup>-/-</sup>* 変異マウスにおいても、体毛の向きのパターニングの異常が報告されており、PCP に異常があると考えられる (50)。なお、ノックアウトマウスのヘテロ変異マウス (*Celsr1<sup>+/-</sup>*) では表現型に異常が見られず、*Celsr1<sup>Crsh/+</sup>* では表現型に異常があることなどから、*Celsr1<sup>Crsh</sup>* 変異体では翻訳された Celsr1 タンパク質の変異体がドミナントネガティブとして働くことが考えられる。

## 1.2 マウスの卵管

### 1.2.1 卵管の構造

卵管は卵巣と子宮をつなぐ管であり、そこで卵が卵巣側から子宮側へと輸送され、精子は逆に子宮側よりさかのぼる (図 1.7)。卵管は卵巣側より采、漏斗、膨大部、狭部の 4 つの部分より構成されており、膨大部では受精が行われる (図 1.7C, 1.8A)。卵管は外周を卵管筋層 (myosalpinx) で包まれた上皮と薄い間質 (stroma) によって成り立つ (53)。卵管上皮は一つの細胞に多数の繊毛が頂端面に存在する多繊毛細胞と分泌細胞によって成り立っている。采の上皮では繊毛がすばやく往復運動し、その運動によって卵管上皮での分泌液の流れが作り出され、排卵された卵が膨大部へと運ばれる可能性がある (54)。

繊毛運動は分泌液の流れを押し進める有効打と、繊毛が元の位置に戻る回復打によって成り立っており、その非対称な運動によって流れを作り出すことができる。ラットとウサギにおいては筋肉の収縮を欠いても、卵管は卵を輸送することができる (55, 56)。しかし、ヒトにおいては繊毛に異常がある Kartagener 症候群を患いながらも妊娠可能である女性の存在が報告されており、繊毛運動が生殖に必須でないことも示唆されている (57, 58)。卵の輸送は卵管上皮での分泌液の流れ、筋肉収縮と卵巣嚢内の水圧など複数の要因によって引き起こされているかもしれない。

マウスの卵管は直径 0.3–0.5mm、長さ約 1.8cm の管であり、ヒトやウサギの卵管とは異なり約 11



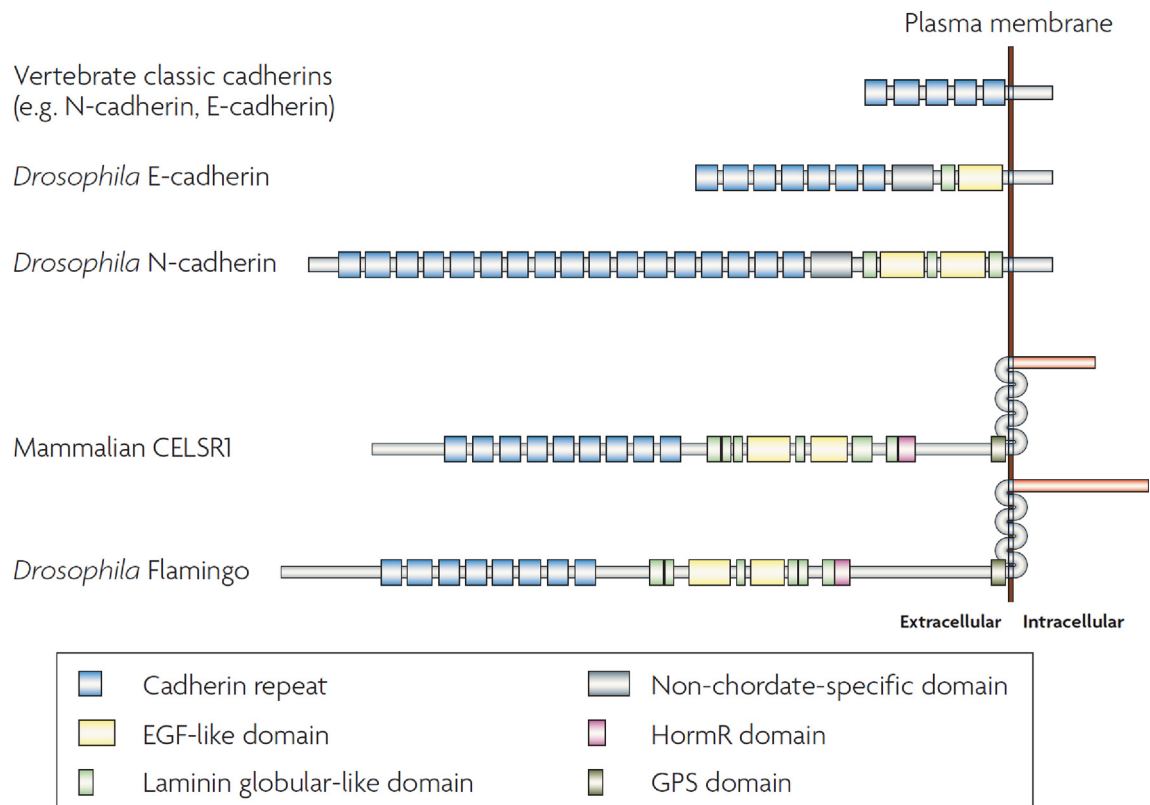


図 1.6 カドヘリンスーパーファミリーのドメイン構造

脊椎動物で典型的なカドヘリン、キイロショウジョウバエの E-カドヘリンと N-カドヘリン、哺乳類の Celsr1 および、キイロショウジョウバエの Flamingo タンパク質のドメイン構造。  
(42) より引用。

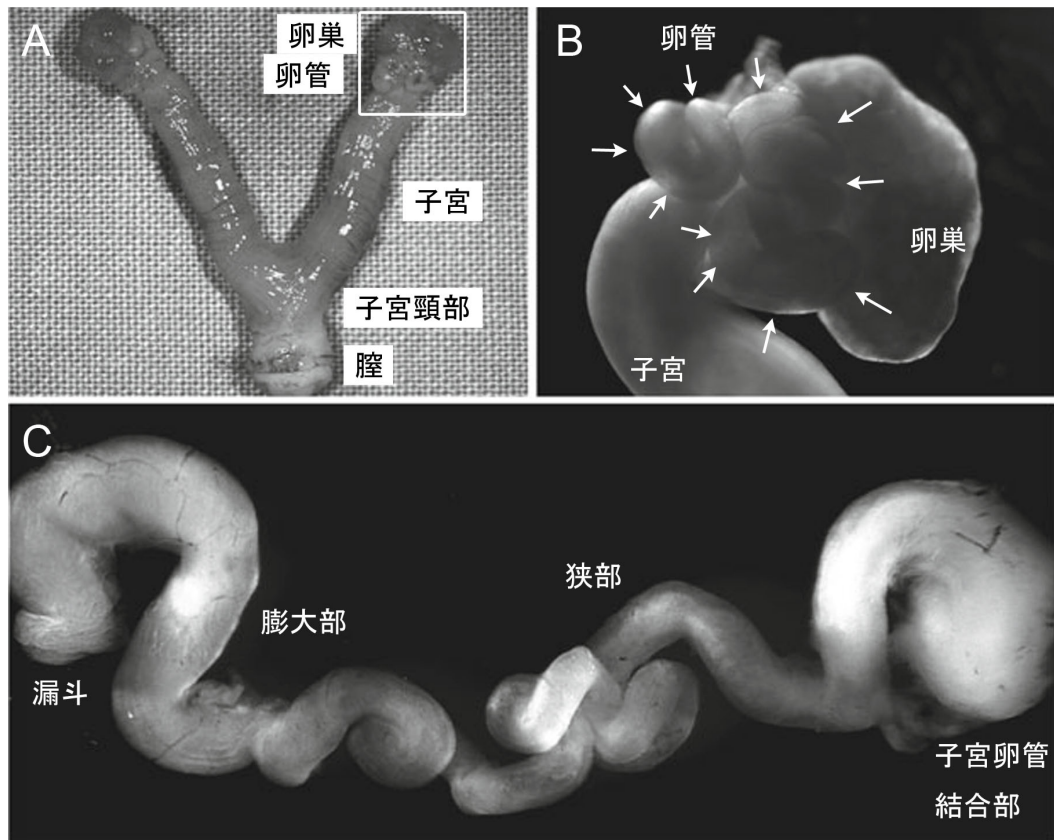


図 1.7 マウスの雌性生殖器官の形態

(A) メスマウスの生殖器官の全体像。白枠は (B) で示す卵管周辺の領域。(B) 卵管周辺の拡大図。卵管は卵巢の近傍で幾重にも湾曲している (矢印)。(C) 部分的に卵管間膜を切断し、やや直線的にした卵管。

(53) より引用、改変。

回湾曲している (図 1.8A) (53, 59)。漏斗部-膨大部の卵管上皮は約 17-19 個のヒダ状の構造をつくり (59)、このようなヒダ構造は鳥類、両生類、哺乳類で広く見られる (53, 60, 61)。マウス卵管上皮のヒダ構造は卵巢-子宮軸 (L 軸; Longitudinal axis) に対して平行に真っ直ぐ伸びている (図 1.8B)。マウスは 4-5 日で不完全周期性の性周期を有しており (図 1.8C)、排卵後の発情期では複数の卵が膨大部で一旦とどまる。膨大部では繊毛細胞の割合が 8 割程度であるのに対し、狭部では 1 割程度と上皮細胞の構成は部位によって異なる (62)。また、膨大部では管の直径が大きく、卵管筋層が薄いのに対し、狭部では管の直径が小さく、卵管筋層が厚いなどの部位ごとの違いも見られる。

なお、本研究では主に卵管の漏斗を対象とした。卵管間膜を部分的に切断することによって卵管を直線的にし、漏斗部を切り出した (図 1.9)。本研究でいう卵巢-子宮軸 (L 軸) とは、湾曲した卵管に沿った軸を指す。また、本文中でいう卵管上皮の平面とは、切り出した漏斗部をさらに L 軸に沿って切開することによって観察できる、卵管の内側の表面のヒダ構造等で湾曲した上皮シートのことを指すこととする (図 1.9)。

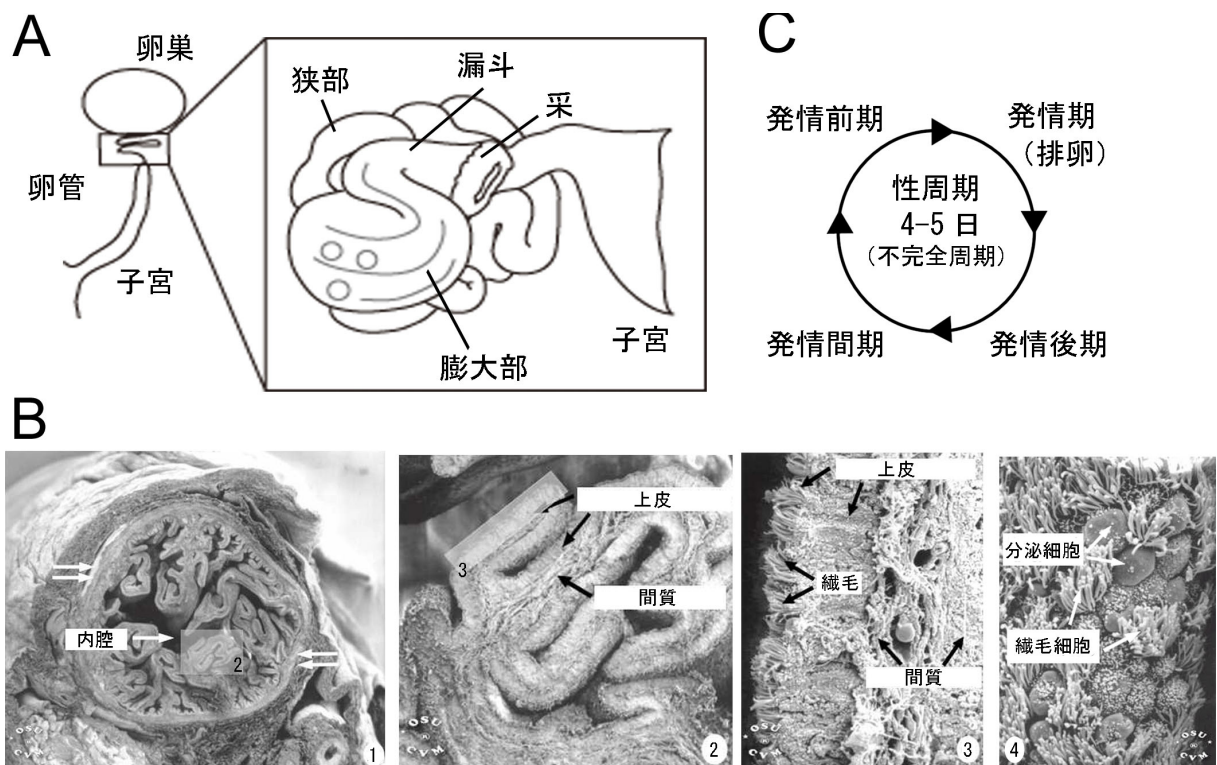


図 1.8 マウスの卵管と性周期

(A) メスマウスの生殖器官と卵管の模式図。(B) マウス卵管の走査型電子顕微鏡像。(1) 卵管膨大部の断面。(2) ヒダの拡大図。(3) 上皮断面の拡大図。(2)、(3) はそれぞれ (1)、(2) 図中の一部の拡大図。(4) 上皮平面の拡大図。(C) マウスの性周期の模式図。  
(B) は (63) より引用。

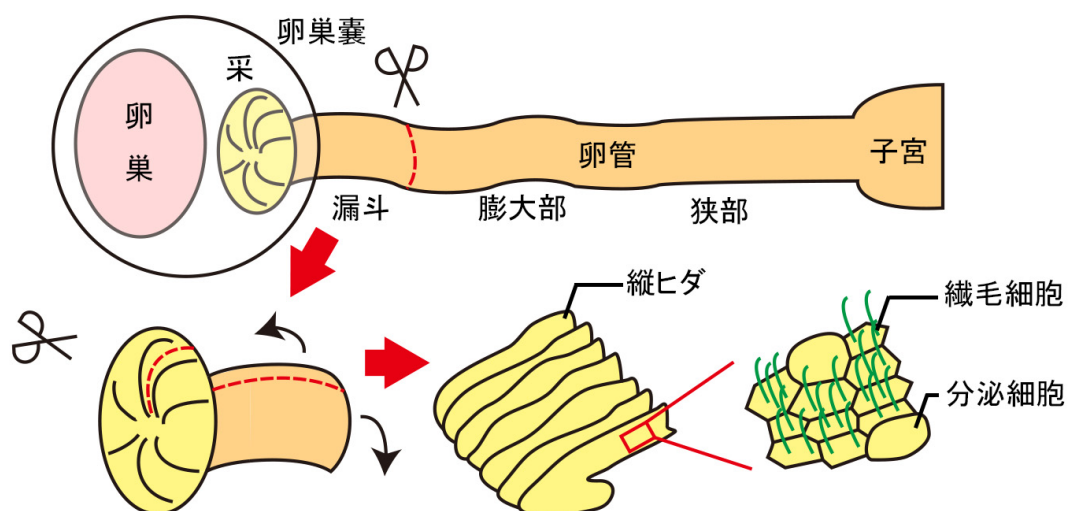


図 1.9 本研究における卵管の扱い

直線的にした卵管の漏斗部分を切り出し、さらに管に沿って縦に開いて上皮を観察した。

### 1.2.2 マウス卵管の発生

**出生前の発生** 卵管、子宮を含む雌性生殖管はミュラー管 (Müllerian duct)/中腎傍管 (paramesonephric duct) に発生の起源を持つ。受精後 9.5 日目 (E9.5) のマウス胚では、雌雄いずれにおいても、中間中胚葉よりウォルフ管 (Wolffian duct)/中腎管 (mesonephric duct) が形成され、E11.75 ではミュラー管が中腎上皮 (mesonephric epithelium) より陥入して形成される (53,64)。この際の陥入は、開放端を持つ管を形成し、開放端は後の卵管采となる (53,65)。陥入後はミュラー管、ウォルフ管はいずれも尿生殖洞 (urogenital sinus) へ向かって管が後方に伸長し、両管は隣接したまま E13.5 まで発生が進む。雄では分化が進んで精巣にセルトリ細胞ができ、抗ミュラー管ホルモン (AMH; anti Müllerian hormone) が産生される。抗ミュラー管ホルモンはミュラー管で発現している受容体 AMHR2 (AMH receptor type2) によって受容され、雄ではミュラー管が退縮する。雌ではミュラー管は真っ直ぐなまま伸長し、前側の領域は卵巣の周辺で湾曲する。妊娠の後期ではミュラー管の後側の直径が前側よりも増加し、卵管領域と子宮領域の違いが現れる。

**出生後の発生** 出生後数日で、ミュラー管は分化が進み、卵管、子宮、子宮頸部、膣の前側それぞれの構造が明瞭になって、組織特異的な遺伝子 (卵管: *Hoxa9*、子宮: *Hoxa10*、子宮頸部: *Hoxa11*、膣の前側 *Hoxa13*) が発現するようになる (66)。卵管は管が伸長するとともに P15(生後 15 日目) までに湾曲の回数が増加する (53)。管の直径も徐々に増し、上皮ではヒダ構造の数と各ヒダ構造の大きさが増す (59)。

**ヒダ構造の形成** ヒダ構造には 2 種類あることが知られており、上皮のみのヒダ (epithelial fold) と間質の陥入を伴うヒダ (fold with stroma) である (図 1.10A) (59)。これらのヒダはいずれも卵巣-子宮軸に平行に形成される。上皮のみのヒダの一部では肥厚した上皮が見られ、核が一行に並ばない (図 1.10B)。一方、間質の陥入を伴うヒダでは、上皮の基底面側に間質が入り込み、基底面が頂端面側に湾曲している。発生が進むにつれて間質の陥入を伴うヒダは徐々に増加しており (図 1.10C) (59)、上皮のみのヒダから間質の陥入を伴うヒダへと変化していくと考えられるが、真偽はまだ明らかになっていない。

**上皮の分化** 上皮細胞の分化も出生後に進む。P2 の卵管采の上皮では多繊毛細胞は少なく、頂端面がドームを形成している細胞が多い (図 1.11) (67, 小松紘司博士)。発生が進むにつれて、頂端面がドームを形成している細胞の割合は減り、多繊毛細胞の割合が P2 での 6% から 11 週齢では 76% に上昇する (図 1.11) (67, 小松紘司博士)。繊毛運動の動きも発生過程に沿って変化する。P2、P5 では方向性が定まらないような繊毛運動を示すことが多いが、長い繊毛を持つ細胞が増えるにつれ、P13 以降では卵巣側から子宮側へと方向性をもった繊毛運動が多い (67, 小松紘司博士)。

### 1.2.3 卵管上皮の繊毛運動周波数

繊毛運動周波数 (CBF; Ciliary beat frequency) は繊毛活性を測る有用な指標である。CBF を測定する複数の方法が開発されている (68)。古典的な方法はストロボスコープが CBF と同調することや光電流の振動に基づいている (69,70)。現在では高速度 CCD カメラ等で取得した顕微鏡画像から自動解析によって CBF を測定することも可能である (71–73)。顕微鏡で取得した画像を関心領域 (ROI;



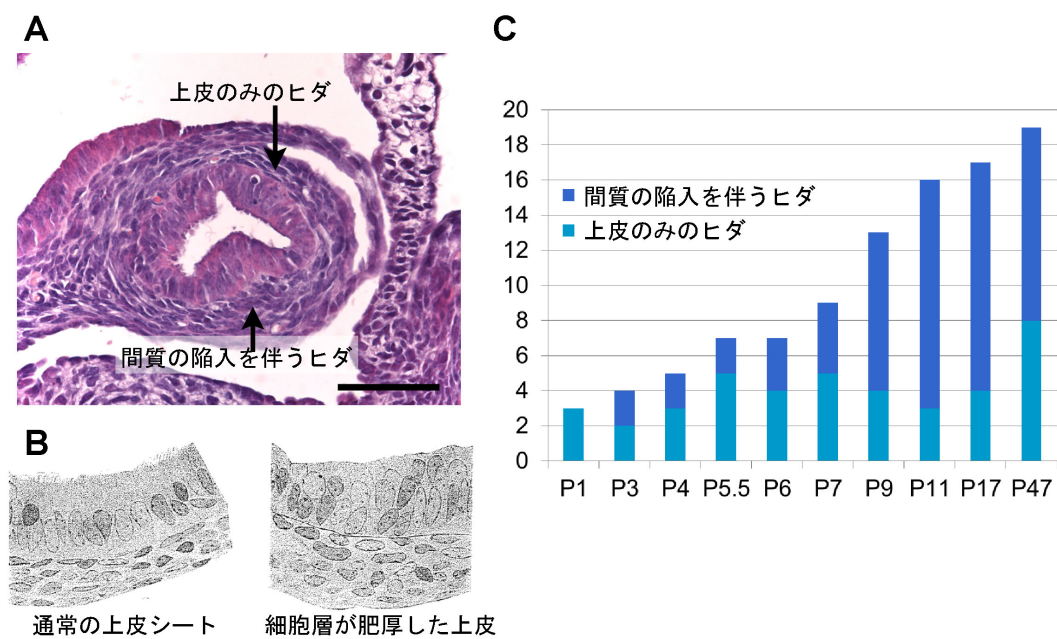


図 1.10 ヒダ構造の形成

(A) ヘマトキシリン・エオジン染色した P2 の卵管の切片。Bar = 50 $\mu$ m. (B) 卵管上皮のスケッチ。上皮のみのヒダでは、通常の上皮シート (左) に比べて、細胞層の厚さが増し、核が一行に並ばないことがある (右)。(C) 発生過程における断面あたりのヒダの数。卵管漏斗付近の切片の結果をまとめた。(A) は小松紘司博士の未発表データ。(B, C) は (59) より引用。

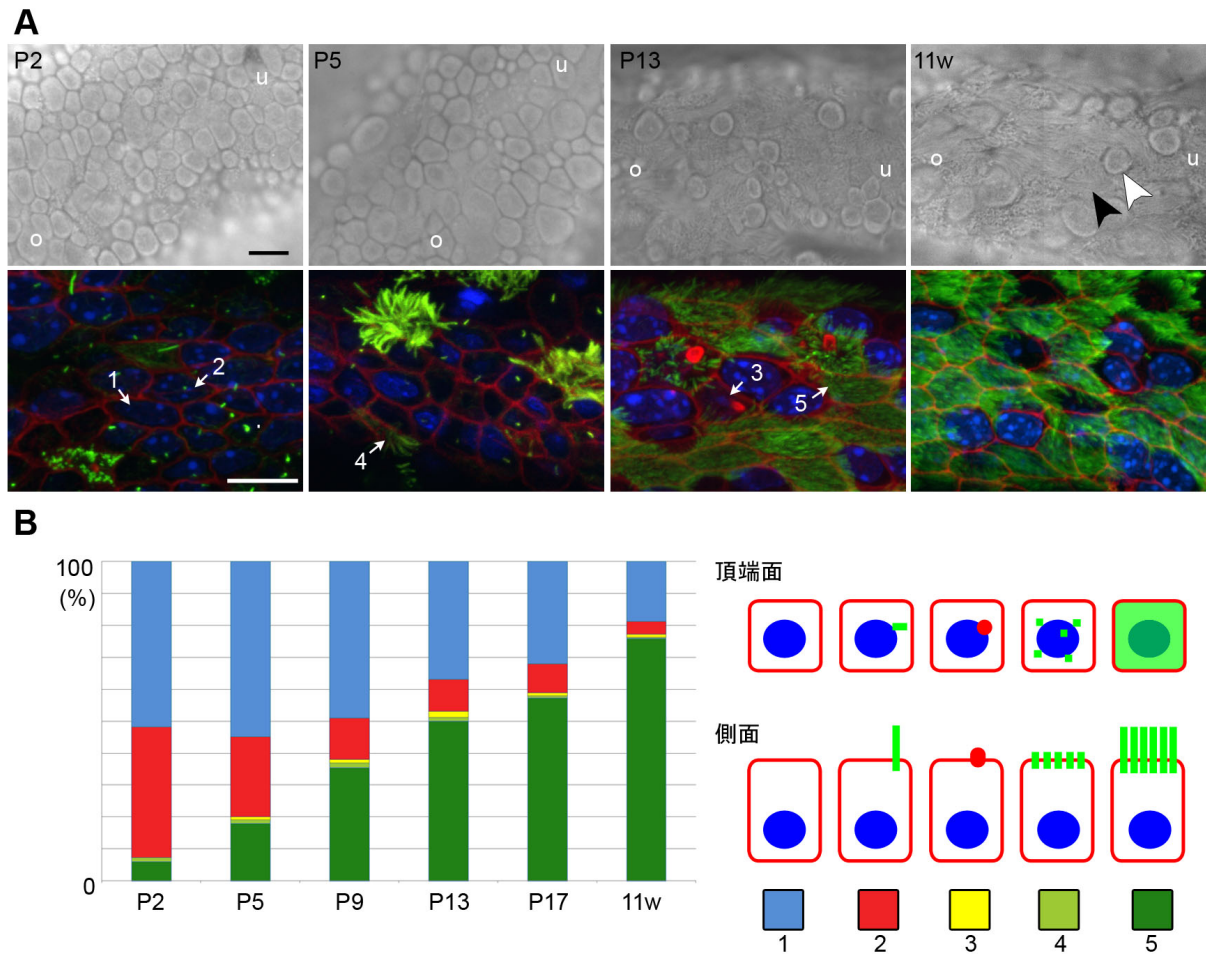


図 1.11 出生後の卵管上皮の発生

(A) 上段は高速度 CCD カメラによって撮影された卵管漏斗付近の繊毛運動のスナップショット。頂端面がドームを形成している細胞 (白矢頭) と、平坦な頂端面を持つ細胞 (黒矢頭) の 2 種類の細胞が観察された。下段は卵管上皮の免疫染色図。繊毛 (緑) は抗アセチル化チューブリン抗体、F-アクチン (赤) は Phalloidin、核 (青) は Hoechst によりそれぞれ可視化された。共焦点顕微鏡で観察し、最大輝度投影図を示した。o: 卵巣側、u: 子宮側。数字は (B) で分類したタイプの細胞の代表例を示す。Bar = 50µm. (B) 発生過程における各タイプの細胞の存在割合。5 つのタイプの細胞に分類した。棒グラフの色は右側のパネルの各タイプの細胞と関連付けた。1) は繊毛がない細胞、2) は 1 次繊毛 (primary cilia) をもつ細胞、3) は F-アクチンの突起が見られる細胞、4) は未熟な短い繊毛を多く持つ細胞、5) は長い繊毛を多く持つ細胞をそれぞれ示す。

(67, 小松紘司博士) より引用。

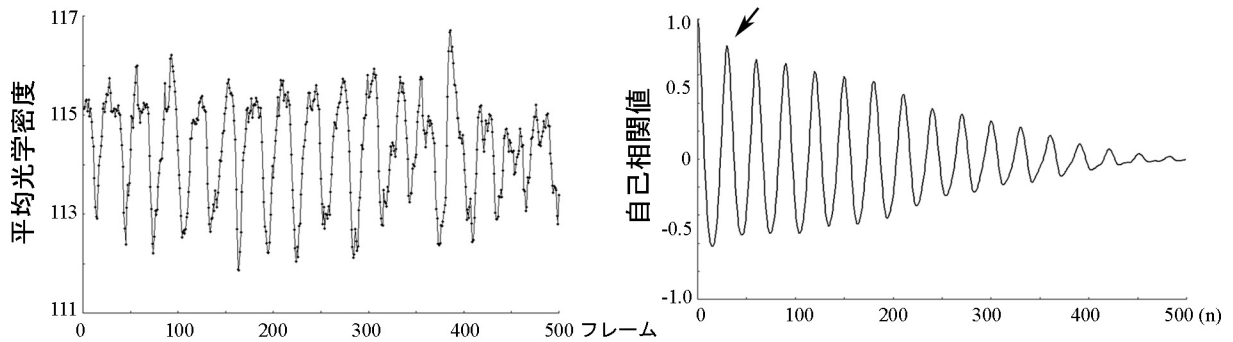


図 1.12 CBF 測定の原理

(A) 繊毛運動の動画の光学密度 (OD) は周期的に変動する。1 フレーム = 5 ミリ秒。(B) (A) の OD プロットを  $n$  フレームずらしたときの自己相関値。矢印は最初の極大値を示す ( $n = 30$ )。この例の場合は CBF は  $200/30 = 6.7(\text{Hz})$  と計算される。

Region of interest) の光学密度 (OD; Optical density) (輝度の平均値) の時間に対する変化を用いて処理することはよく用いられている方法である (74, 75)。CBF は OD の時間変化に対する高速フーリエ変換 (FFT; fast Fourier transform)、または自己相関関数によって計算される。OD の自己相関のプロットは周期的であり、最初の極大値をとる点が 1 周期の時間に相当し、CBF が算出される (図 1.12)。自己相関関数を用いる方法は FFT を用いる方法に比べてノイズに影響されないことが指摘されている (76)。

CBF はヒトの気管と卵管でよく調べられている。ヒトの卵管の CBF の値は 5–20 Hz の広い範囲で報告されており (77–79)、この差異は測定に用いた方法の違いに由るものである可能性がある。月経周期に応じて CBF が変化するかどうかは見解が一致していない。ウサギの卵管では、卵が子宮方向へ運ばれる時期にあたる交尾の 2–3 日後に CBF が 20% 上昇する (80)。ヒトの卵管では Weström らが月経周期間でも卵管の部位間 (漏斗、膨大部、狭部) でも CBF に違いはなかったと報告したのに対し (77)、山岡は部位間では CBF に差があるものの、月経周期間では有意な差はなかったと報告した (79)。一方、Critoph と Dennis は CBF が排卵後に膨大部と狭部のみににおいて有意に上昇すると報告し (81)、Lyons らは排卵後の分泌期に漏斗で CBF が上昇すると報告した (82)。

### 1.3 上皮組織の突出を引き起こす力学的要因

上皮組織は胚発生の過程で様々な形態をとって、多様な機能を果たす器官を形成する。上皮が頂端面側へ突出する際の力学的要因を、上皮細胞に由来するものと、上皮細胞外によるものとに分けることができる (図 1.13)。

### 1.4 本研究の目的

前述のように、マウスの卵管は細胞レベルから器官レベルまで多階層にわたる極性を有しており、その極性の形成機構は今まで明らかではなかった。そこで私は、マウス卵管上皮の極性の一つである繊毛運動について観察し記述するとともに、PCP 因子に着目してその役割を調べた。PCP 因子の一

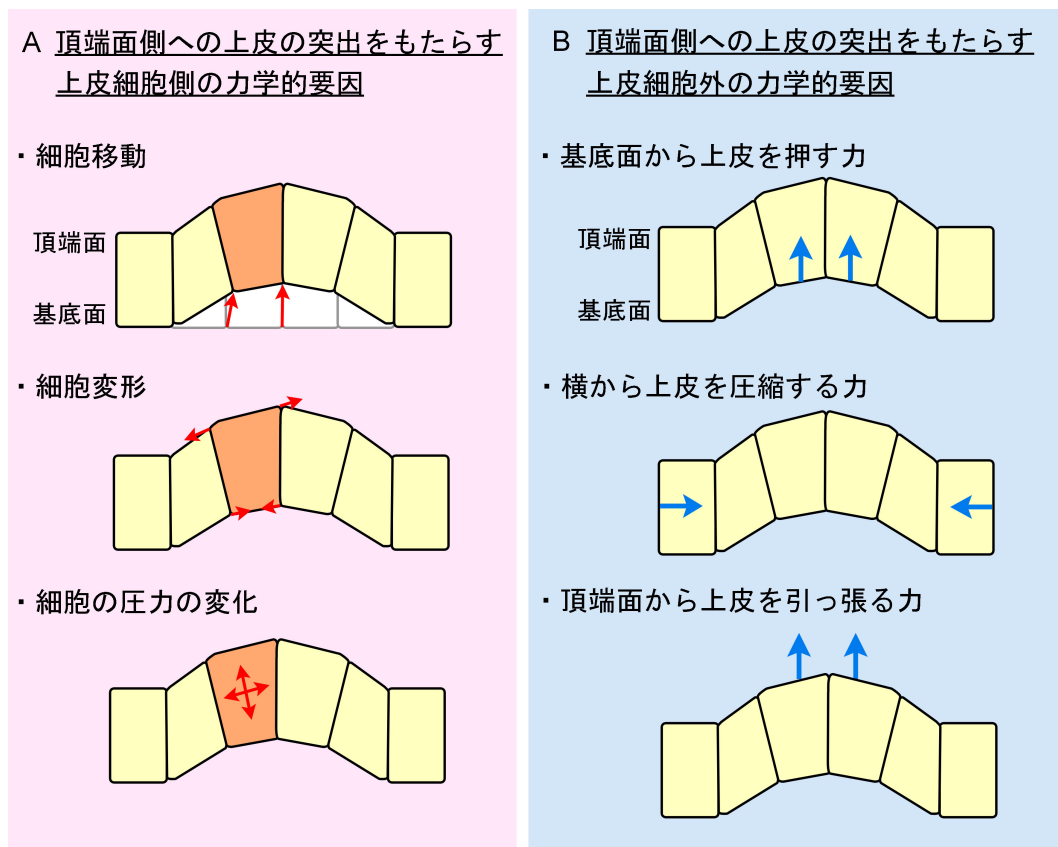


図 1.13 上皮組織が頂端面側へ突出するときと考えられる力学的要因

(A, B) 上皮組織が頂端面側に突出すると仮定した場合に考えられる、上皮細胞側による要因と (A)、上皮細胞の外部からの要因 (B) をまとめた模式図。(A) では上皮が突出する際の、橙色の細胞による働きを矢印で示した。矢印が必ずしも力の方向と作用点を表すものではないことに注意されたい。

つである *Celsr1* を欠損したマウスを観察したところ、これらの極性が損なわれることが分かった。そこで、*Celsr1* がどのようにこれらの極性形成を制御しているかを調べるために、*Celsr1* 変異細胞を用いたモザイク解析を行った。

## 第2章 マウス卵管上皮の繊毛運動

### 2.1 結果

#### 2.1.1 卵管上皮の高速度カメラによる観察

マウス卵管の漏斗を切り出して管が伸びている L 軸 (Longitudinal axis) に沿って切開し、現れた内腔の上皮を hanging-drop 法を使用して、高速度 CCD カメラを用いて秒速 200 フレームで 2.5 秒間で撮影した (図 2.1)。卵管上皮の繊毛は子宮側にのみ大きく倒れ、平面内で繊毛細胞の極性がそろっていた (図 2.2A, B)。繊毛が折り返すタイミングを目視で測定したところ、多繊毛細胞の繊毛往復運動は非対称で、子宮側に向かう有効打は卵巣側へ向かう回復打よりも 2–3 倍速かった (図 2.2C)。

#### 2.1.2 自己相関関数を用いた繊毛運動周波数の測定

取得した動画より、繊毛に焦点があっている ROI (Region Of Interest; 関心領域) (20 ピクセル (3.7 $\mu$ m)  $\times$  20 ピクセル; 上皮細胞の頂端面の面積の約 1/3–1/4) を選び CBF を測定した。CBF の測定にはそれぞれの ROI の OD (Optical Density; 光学密度) が時間に対して、CBF と協調する形で周期的に変化することを利用し、自己相関解析を行った (図 1.12)。自己相関値のプロットが最初の極大値をとるとき、OD( $t$ ) ( $t$  は時間) はちょうど 1 周期分ずれていると見なすことができ、その時間を繊毛運動の周期とした。観察環境の安定性を調べるため、同じ視野で 1 分間隔で 11 回動画 (各動画は 500 フレーム/秒で 2.5 秒間撮影) を取得して CBF を測定したところ、時間内で顕著な CBF の変化は見られなかった (図 2.3) ( $n = 3$ )。卵管上皮を解剖する際の影響でいくつかの領域で繊毛が運動しなくなったが、多くの繊毛は 30 分以上運動し続けた。これらの結果は繊毛運動が安定した環境で観察できていることを示唆する。また、PBS (-), PBS (+), DH (Dulbecco's Modified of Eagle's Medium/Ham's F-12 (1:1)) の 3 種類の培地で CBF を測定したが、顕著な差は認められなかった (表 2.1)。以降の実験では PBS (-) を培地として用いた。

培地	平均 CBF(Hz)	標準偏差	サンプル数
PBS (-)	9.7	2.3	3 卵管 363 箇所
PBS (+)	11.5	3.9	3 卵管 351 箇所
DH*	10.4	4.9	2 卵管 228 箇所

\*Dulbecco's Modified of Eagle's Medium/Ham's F-12 (1:1)

表 2.1 培地が CBF 測定に与える影響

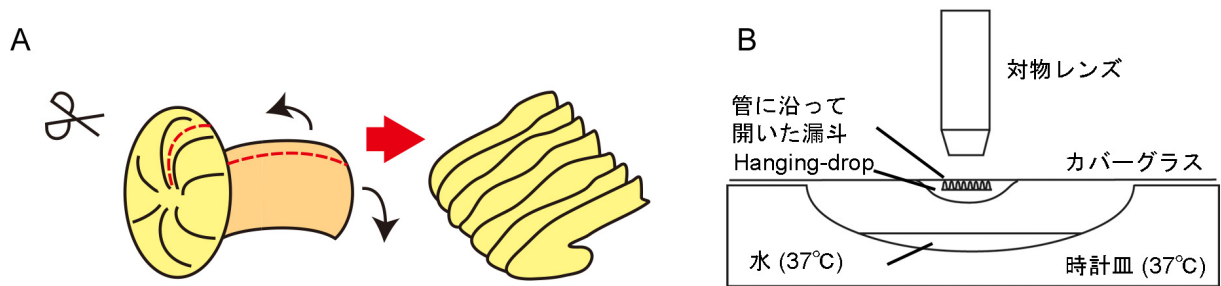


図 2.1 卵管上皮観察の方法

(A) マウス卵管解剖の模式図。卵管の漏斗を切り出し、卵巣側より管に沿って開いた。免疫染色では開いた状態で固定した。(B) CBF 測定で使われた hanging-drop 法の模式図。カバーガラス上に PBS でドロップをつくり、管に沿って開いた漏斗をドロップの中に入れ、上皮側がカバーガラス面に向くように調整した。その後 37°C に温めた時計皿の上にカバーガラスをひっくり返して乗せ、カバーガラス越しに繊毛運動を観察した。時計皿の中には 37°C に温めた水をいれ、hanging-drop が乾かないようにした。

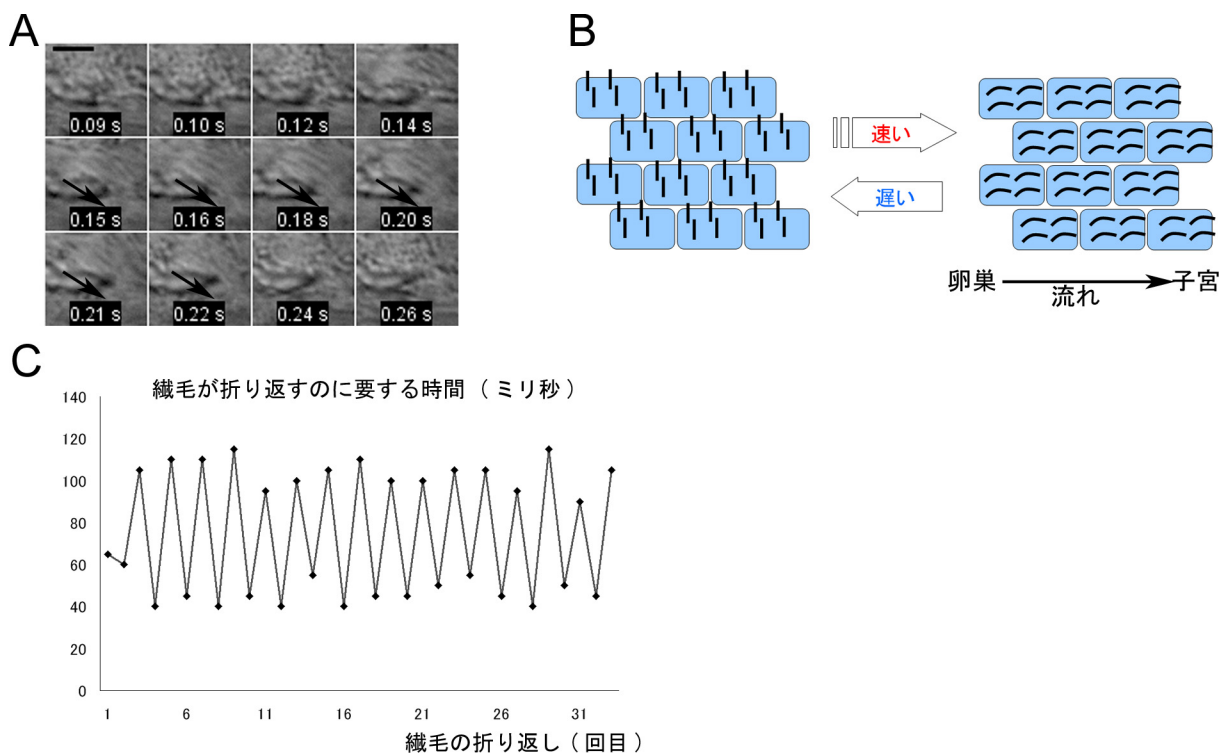


図 2.2 マウス卵管上皮の繊毛運動

(A) 高速度カメラでとらえた繊毛運動。矢印は繊毛が倒れている方向を示す。Bar = 10μm (B) 卵管上皮の繊毛運動の模式図。繊毛は子宮側にのみ大きく速く倒れ、往復運動も非対称だった。(C) 繊毛が半往復するのにかかる時間の遷移。時間の長い繊毛運動と時間の短い繊毛運動が交互に行われていた。

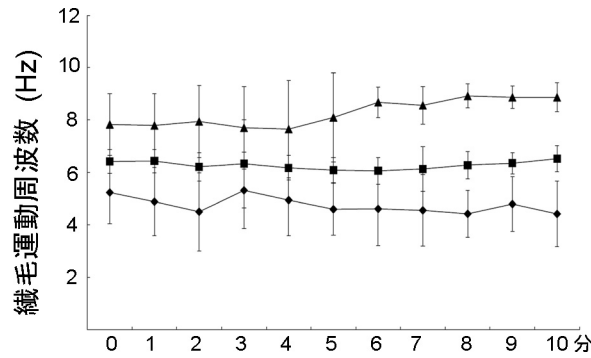


図 2.3 CBF 測定の安定性

1 分間隔で同一視野から 25 個の ROI (20 ピクセル × 20 ピクセル) を選び、CBF を測定し、有効な測定 (OD(t) の自己相関値の最初の極大値が 0.2 以上) のうちの各時間での平均と標準偏差を表した。異なるシンボル (▲, ■, ◆) は異なる卵管での測定を示している (n=3)。代表的な OD(t) や、自己相関関数のプロットについては図 1.12 参照

### 2.1.3 卵管上皮の繊毛運動周波数

卵管の漏斗上皮の繊毛運動の動画から計 2400 ROI を選び CBF を測定した。最初の極大値での自己相関値の平均は 0.36 で、最頻区間は 0.4–0.5 であった (図 2.4A; 全測定結果)。最初の極大値での自己相関値が高いことは繊毛運動の周期性が高いことを意味し、これらの結果から 3.7μm (20 ピクセル) 四方で録画した 2.5 秒間は繊毛が規則正しく運動していることがわかる。次に、同一平面内の異なる領域の CBF を比較した (図 2.4B)。繊毛運動の周期の卵管上皮での分布を調べると、隣接する領域においても繊毛は異なる周期で運動することがあることがわかった。この結果は測定誤差によるものである可能性もあるが、実際に取得した動画のいくつかの領域では、2.5 秒間内に、同じ位相だった隣接する領域の繊毛が逆の位相を持つようになったことが観察された。これらの結果は隣接する領域においても CBF はいつも同調しているわけではないことを示唆する。これらの観察から、図 2.4A で示すように繊毛は ROI 内においては、高い自己相関値が示すように規則正しく運動をしているが、卵管上皮の平面内においてはある程度の周波数の幅を持っていることがわかった (例えば図 2.4B では 5.4–7.1 Hz)。

CBF と性周期の関係を調べるため、発情間期と発情期のメスマウス (8–12 週齢) を 4 匹ずつ観察した。1 つの卵管あたり異なる視野で動画を 6 つ取得し、解剖の影響を抑えるため卵管を L 軸に沿って開いてから 15 分以内にすべての動画を録画した。CBF を解析したところ、漏斗における卵管上皮の CBF は発情間期 (排卵前) で  $10.9 \pm 3.3$  Hz、発情期 (排卵後) で  $8.5 \pm 2.5$  Hz であった (平均 ± 標準偏差) (図 2.4C、表 2.2)。CBF はいずれの性周期においても正規分布に近い分布を示した (図 2.4D)。

### 2.1.4 繊毛による卵の輸送

組織を解剖したときに血球や他の細胞が培地の中で卵管からはがれ、その後漏斗において、これらの細胞が漏斗上で膨大部側に向かって一方に運ばれるのを観察した (図 2.5A)。これらの細胞の動きは卵巣–子宮軸での方向性を持った流れを反映していた。卵管が大きな卵丘・卵母細胞複合体 (COC) を輸送できるかどうかを調べるため、COC を漏斗の卵巣側の端である采付近に置いた。COC は卵管



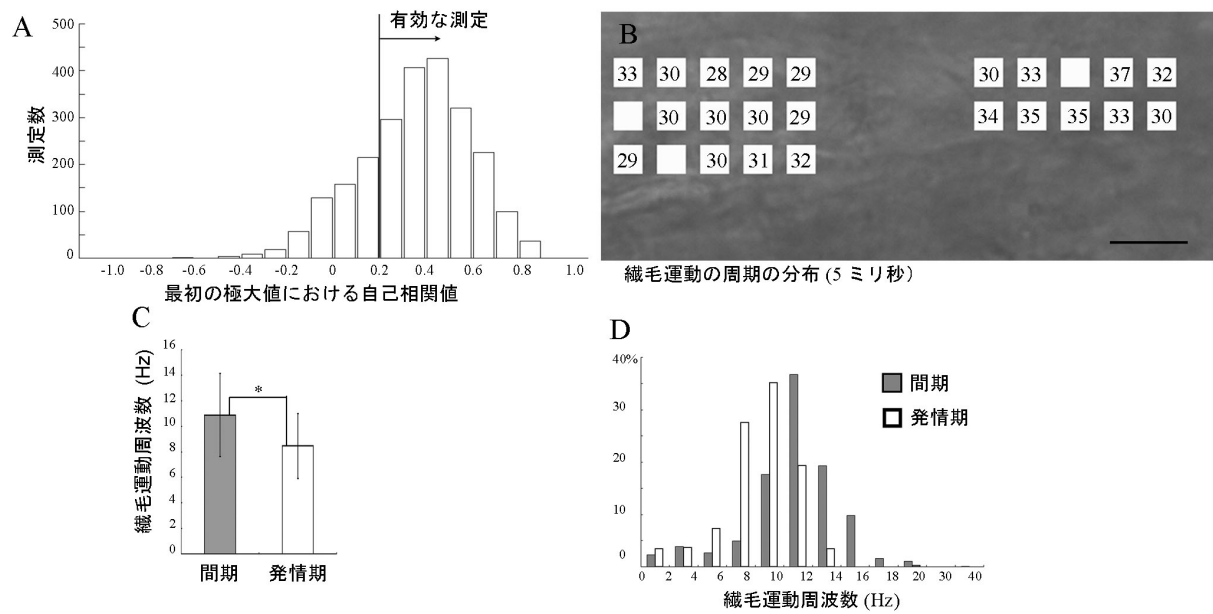


図 2.4 卵管上皮の CBF

(A, B) 繊毛は局所的に高い周期性を持つ運動をするが、周期 (5 ミリ秒) は卵管上皮内で部位ごとに、2.5 秒の間では、固有の異なる値をとった。(A) 自己相関関数の最初の極大値の分布 ( $n = 1810$ ; ビン幅 = 0.1)。(B) CBF の卵管上皮での分布。白い四角の ROI で平均 OD を測定し、自己相関値が最初の極大値をとるときのずらしたフレーム数 (1 フレームは 5 ミリ秒に相当) を表した。例えば左上の “33” では  $33 \times 5 = 165$  ミリ秒が周期であることを表す。数字がない四角は自己相関関数の最初の極大値が 0.2 以下で、CBF 測定が有効ではなかったことを示す。Bar =  $10\mu\text{m}$  (C, D) 異なる性周期における卵管上皮の CBF の比較。(C) (発情) 間期と発情期における CBF の平均。間期と発情期でそれぞれ 1200 回 CBF の測定を行い、有効測定数はそれぞれ 931、879 だった ( $n =$  マウス 4 匹、8 卵管/各性周期)。\*は対応のない両側 t 検定で  $P < 0.0001$  であったことを示す。(D) 各性周期における CBF の分布。各階級に含まれる測定数の有効測定数に対する割合を示した。

	マウス	卵管	平均 (Hz)	標準偏差	有効測定数	膨大部の卵
発情間期	A1	1	10.8	3.3	105	
		2	10.7	3.1	123	
	A2	1	12.9	2.0	116	
		2	13.9	3.3	131	
	A3	1	10.0	2.3	122	
		2	10.6	2.0	123	
	A4	1	7.5	4.3	78	
		2	9.7	1.7	133	
計			10.9	3.3	931	
発情期	B1	1	8.2	1.5	126	
		2	7.1	2.1	130	
	B2	1	8.4	3.6	97	+
		2	10.3	1.7	116	+
	B3	1	9.8	1.7	121	+
		2	8.2	2.0	106	+
	B4	1	8.1	2.4	98	+
		2	7.4	3.5	85	+
計			8.5	2.5	879	

+は膨大部に卵があった卵管であることを示す。

表 2.2 各個体の卵管での CBF の比較

内に吸い込まれ、膨大部の方向へ輸送された (図 2.5B–D)。この輸送は発情間期、発情期のいずれの性周期から採取した卵管でもみられた。COC は 10 分以内で 0.5mm 以上運ばれることもあった。また、観察中に筋肉の収縮によって引き起こされるような卵管自体の動きはなかった。

## 2.2 考察

卵は卵管采で集められて、漏斗を通して輸送され、膨大部で受精し、狭部、子宮へと一方向に運ばれるが、卵の動きと輸送の機構は複雑である。ラットでは卵の輸送が生体内で観察されており、卵の代わりのビーズを漏斗に置くと、卵管の内腔にすばやく吸い込まれて膨大部へと運ばれる。一旦膨大部にたどり着くと、ビーズは膨大部で往復運動を始める。この往復運動は筋収縮を阻害する薬剤によって抑制されることから、采から膨大部までの一方向の動きは纖毛運動によるものであるが、膨大部での双方向の運動は筋収縮によるものであることが示唆されている (56)。

本研究では、管に沿って開いた卵管の漏斗において、膨大部へ一方向の分泌液の流れが存在することが観察され、卵の輸送に筋収縮が必ずしも必要ではないことが示唆された。Dixon らは、マウスの卵管において纖毛運動だけでは卵を輸送することができないと報告しているが (83)、この観察は膨

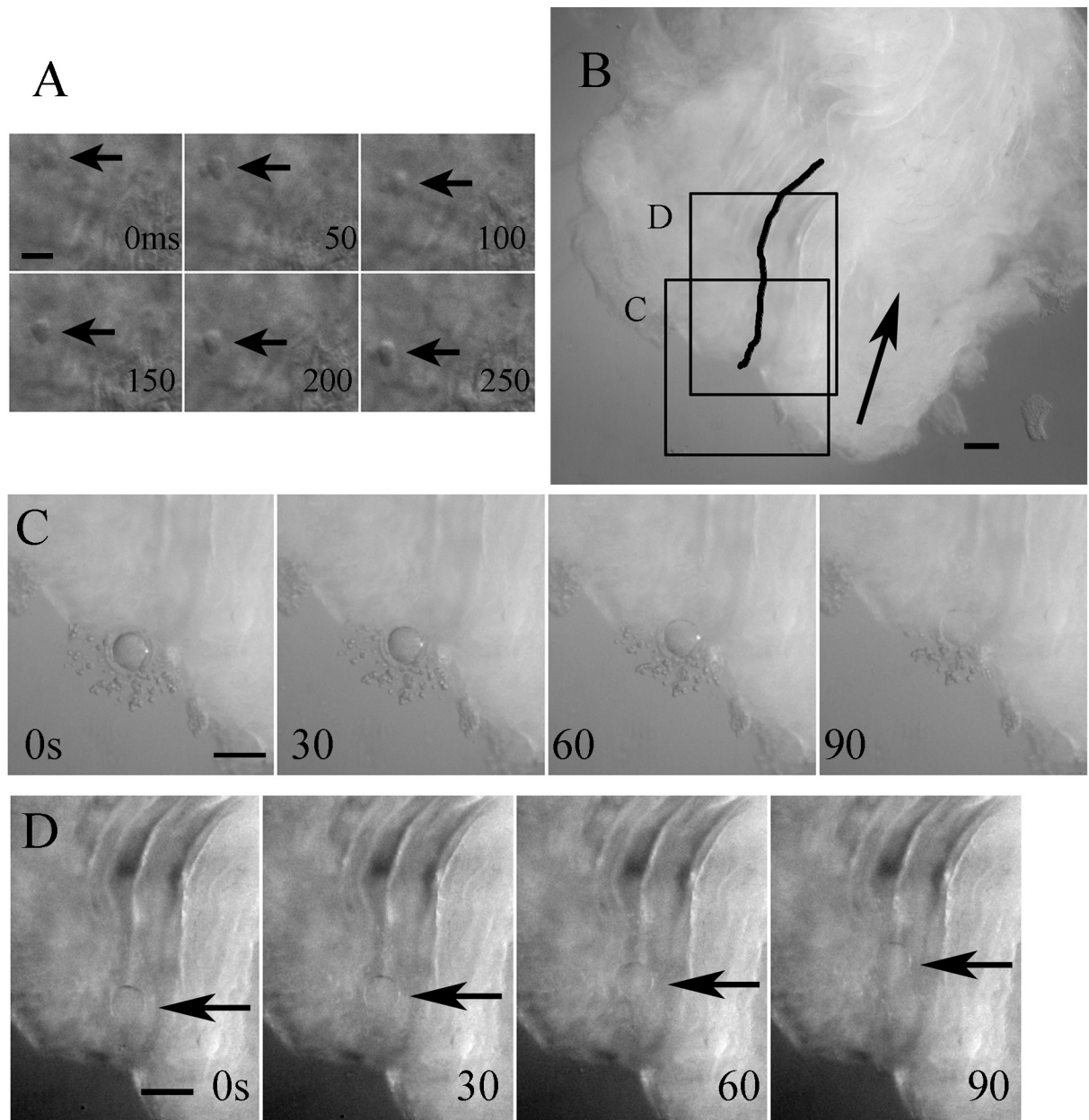


図 2.5 繊毛による卵の輸送

(A) 管に沿って開いた卵管上での小粒子の動き。血球等と思われる小粒子は膨大部(左下)へ向かって一方向に動いた。矢印は小粒子を示す。ms:ミリ秒。(B) 卵管の卵巣側の端(采・漏斗)で卵と卵丘細胞の複合体(COC)が運ばれた様子。黒線はCOCが移動した軌跡を示す。矢印はCOCが移動した方向を示す。四角で囲まれた領域の高倍率像を(C)と(D)に示す。(C) 卵管上皮に接着したCOCが卵管に吸い込まれた。(D) COCは膨大部へ向かって運ばれた。s:秒。Bar =  $10\mu m$ (A),  $100\mu m$  (B-D)

大部付近の領域で行われていると思われ、本研究で用いた漏斗とは部位的に異なる。また、漏斗の組織切片では筋層は薄かった (小松紘司博士 未発表データ)。これらのことから、漏斗での一方向の卵の動きは主に繊毛運動によるものであると考えられる。本研究では、管に沿って開かれた卵管でも卵を輸送できることを示したが、生体内では卵は周囲を卵管に囲まれており、卵がより速く輸送されることも考えられる。卵の輸送を確かなものにするために、生体内において繊毛運動は余剰な輸送能力を有しているかもしれない。繊毛運動によってどのような機構で卵が運ばれているかはほとんど知られていない。卵管内での液流で COC を輸送することができるかについても明らかではない。液流自体ではなく、卵と繊毛の物理的な相互作用が重要な役割を果たしている可能性もある。COC の輸送は卵管上皮と COC の接着によって影響されることも報告されている (83)。フローチャンバーを用いて生体内の流速を人工的に再現することで、液流によって卵が輸送され得るかどうかを調べることができる。

本研究では、hanging-drop 法を用いて卵管漏斗の繊毛運動を直接撮影し、自動化された画像処理法によって、CBF を算出した。自動化された画像処理法は再現可能で、人為的ミスや偏見を防ぐことができる。この方法の原理はヒト気管上皮の CBF 測定にも用いられている (71,75)。マウス卵管上皮はヒダ状構造が発達しており、焦点面に繊毛運動が見られる領域が限られているため、測定に用いる画像の領域は繊毛運動が見られる領域から人為的に選んだ。

本研究では、CBF は自己相関関数 (ACF) が最初の極大値をとるところを用いて算出した。最初の極大値での自己相関値が高いことは繊毛運動の周期性が高いことを意味する。一方、ACF は時間に対する OD の関数  $OD(t)$  の振幅の変化によっても影響される。 $OD(t)$  の振幅変化による影響を避けるため、ACF の最大値ではなく、極大値を用いた。自己相関値は  $OD(t)$  の振幅の変化によって影響されうるが、その場合でも ACF は周期分のフレームをずらしたところで、振幅の変化に関わらず、極大値をとると考えられる。

隣接する領域においても CBF は必ずしも同調しないことを本研究で示した。卵管上皮では上皮の表面を伝播する metachronal wave も観察され。これは水田に風が吹いたとき見える波のような動きで、隣接する物体 (稲など) が相互的な協調作用を行うときに見られる現象である。漏斗上皮は多数の繊毛によって構成されており、このような流体力学的相互作用が起き、結果として CBF が同調することもあると考えられる。これらのことから、隣接する繊毛は物理的な相互作用によって (特に位相的に近い場合)、繊毛運動の位相を協調させているが、基本的には繊毛運動は細胞間で異なる CBF を有しているとの仮説を立てることができる。カルシウムイオンやアデノシン三リン酸 (ATP) などの分子濃度が CBF に影響を与えることが報告されており (84)、細胞間で異なる CBF を生み出す要因の候補として考えられる。また、流体力学のモデルを用いて、非対称性をもたない繊毛の列から、一方向の分泌液の流れや metachronal wave ができうることも報告されており (85)、繊毛同士で協調するような特別な機構がなくても、観察されたような繊毛運動や分泌液の流れが起きる可能性がある。

近年、マウス卵管の CBF が  $23.3 \pm 3.8$  Hz であることが報告され (86)、これは本研究の結果 ( $10.9 \pm 3.3$  Hz と  $8.5 \pm 2.5$  Hz) よりも高い。計測した CBF の違いは観察手法の違いによるものである可能性がある。たとえば、Bylander らは測定する前に 1 日間卵管を培養しているが、本研究では卵管を管に沿って開いてから 15 分以内に繊毛運動を撮影している。また、3.5–5 週齢のマウスを用いた点においても、本研究の 8–12 週齢のマウスと異なっている。培地、温度や画像解析法のいずれも CBF に影響

を与える可能性がある。解析法の正確さを確かめるため、いくつかの動画では繊毛運動を目視によって追跡し、その軌跡から自己相関によって CBF を求めたが、OD(t) を用いた方法と結果はほぼ同じであった (データ非掲載)。このことから、本研究で用いた画像解析法が、繊毛運動の動画から CBF を測定することに成功していることが示唆される。

CBF の高低が卵管の輸送能力とどのような関係にあるのかは自明ではない。ヒトの卵管漏斗では月経周期の黄体期 (排卵後) での CBF が卵胞期 (排卵前) に比べて高いことが報告されているが、この際の CBF の上昇は 20% に満たない (82)。本研究ではマウス卵管の漏斗の CBF が、発情期で  $8.5 \pm 2.5$  Hz であり、(発情) 間期 ( $10.9 \pm 3.3$  Hz) よりも低かったことを報告したが、図 2.4D に示すように CBF は広く分布しており、平均 CBF のこの僅かな違いが卵管の輸送能力にどれだけの影響を与えるかは明らかではない。発情期、間期のいずれにおいても、管に沿って開かれた卵管が一方向の流れを作り出し、卵を輸送できることが観察された。また、卵管での小粒子の輸送速度が発情後期と妊娠・着床後とで違いがないことも報告されている (83)。生理的な範囲内での高い CBF が高い輸送能力につながるかどうかは、卵管の CBF と輸送能力を同時に測定するような実験が必要である。CBF に加え、卵管の径や分泌活性、繊毛細胞の数なども輸送能力に影響する可能性がある。

発情期と間期の CBF に差が認められたことは、CBF が性周期に応じて変化している可能性があることを示唆する。エストラジオールとプロゲステロンは性周期の制御で主要な役割を果たしていると考えられているホルモンであり、卵管の CBF にも影響を与えることが報告されている (68,87)。高い投与量でエストラジオールは CBF を上昇させ、低い投与量では CBF を降下させる一方 (87)、プロゲステロンは CBF を降下させることがモルモット (87) とマウス (86) を用いた実験で報告されている。一般的に、発情期ではエストラジオールの濃度が高く、発情間期ではプロゲステロンの濃度が高い。モルモットでは、発情期、発情間期の初期、中期、終期において CBF がそれぞれ 13.5Hz、17Hz、12Hz、15Hz であることが報告されており、CBF の変化は複雑である (87)。本研究で用いたマウスのホルモン濃度は明らかではないが、CBF の性周期間における差は複数のホルモンの影響によるものである可能性がある。

本研究で報告した CBF 測定では、卵管は開いた後に培地に浸され、すぐに観察されたため、生体内に準じた環境で実験が行われた。ヒトの卵管を用いた CBF 測定は複数報告されているが (77,79,81,82)、ヒト組織の利用は限られている。本研究により、遺伝学や分子生物学的実験が可能なマウスは、卵輸送を研究する上で有用なモデル動物となりうることがわかった。また、異なる種での観察は、哺乳類の生殖における普遍的な原理を考える上でも重要である。マウス卵管の形はウサギやヒトと異なるが、卵輸送において、漏斗の繊毛が果たす役割は異なる種間でも変わらないことが、本研究の観察から示唆される。

## 第3章 マウス卵管上皮の形態形成における PCP 因子の役割

### 3.1 結果

#### 3.1.1 Celsr1 タンパク質の細胞内局在の偏りは繊毛形成前に起こる

卵管の卵巣側端の漏斗に集中して解析を行った。漏斗は繊毛細胞の割合が他の卵管の部位に比べて高く (59)、繊毛形成は少なくとも 3 週齢まで持続的に行われる (67, 小松紘司博士)。繊毛運動は卵巣-子宮軸 (以降 L 軸) に沿って行われており、平面内細胞極性 (PCP) の形態の一つであるといえる。RT-PCR 法を用いて成熟したマウス卵管において、既知の PCP 因子の発現を調べた所、*Celsr1*, -2, *Vangl1*, -2, *Dvl1*, -2, *Pk2*, -3, *Fz1*, 2, 3, 6, -8, *Ptk7* の発現が検出された (67, 小松紘司博士)。そこで *Celsr1* に着目して更なる解析を行った。卵管を輪切りの方向で切片を作成し、免疫染色を用いて *Celsr1* タンパク質の局在を調べた所、*Celsr1* が上皮のみに発現し、上皮の基部側の間質では発現が認められなかった (図 3.1) (67, 小松紘司博士)。次に、卵管を L 軸に沿って開き、上皮の頂端面を観察した (図 2.1A)。

*Celsr1* タンパク質は、Phalloidin によって可視化された F-アクチンが多く存在する頂端面より少し基底面側の上皮細胞の側面 (Lateral side) に局在した (図 3.2)。繊毛細胞同士の細胞境界のみならず、繊毛細胞と非繊毛細胞の境界にも局在した (図 3.3)。非繊毛細胞同士の境界においては、*Celsr1* のシグナルは弱かった。

次に、いくつかの発生ステージのマウス卵管を *Celsr1* 抗体で免疫染色した (図 3.4A–C) (67, 小松紘司博士)。P2(出生後 2 日目) から *Celsr1* タンパク質は細胞境界付近に局在し、成熟したマウスでは、*Celsr1* シグナルは卵管輪切り断面に平行な方向 (以降 C 方向, Circumferential axis) の細胞境界 (L 軸に垂直な細胞境界) に強く局在した。このような局在は、より早い発生ステージの卵管にも認められたが、*Celsr1* シグナルは弱かった。

そこで、*Celsr1* タンパク質の細胞内局在の偏りを、免疫染色の共焦点顕微鏡像より、それぞれの発生ステージにおいて定量的に解析した。細胞の輪郭は Phalloidin 染色のシグナルを元に手動でトレースし、輪郭上の *Celsr1* シグナルを測定した。Aigouy らの方法を参考に数学的変換を行って (88)、各細胞において細胞輪郭のどの部分に *Celsr1* タンパク質が強く局在しているのかを求めた。P2 から 11 週齢 (11w) まで *Celsr1* タンパク質は偏った局在を示し、C 方向の細胞境界に強く局在した (図 3.4D)。一方、Phalloidin シグナルでは顕著な極性は検出されなかった (図 3.4E)。

これらの結果より、*Celsr1* タンパク質は、多くの細胞で多繊毛形成が行われるよりも前の P2 の段階から、細胞内で偏った局在を示した。他の PCP 因子である *Vangl2* のタンパク質も同様な局在パターンを示したことから (図 3.5A, B)、卵管上皮においても、PCP 因子が細胞内局在の偏りを介して PCP を制御することが示唆された。

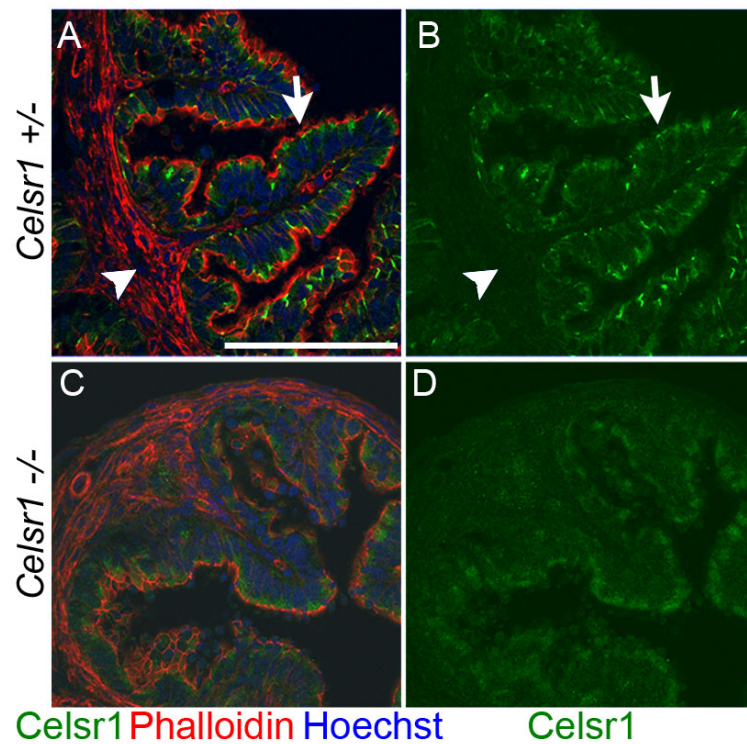


図 3.1 卵管の輪切り方向切片の Celsr1 免疫染色図

(A–D) 卵管の輪切り方向切片の Celsr1 免疫染色図。Celsr1 は緑、F-アクチン (Phalloidin 染色) は赤、核 (Hoechst) は青で示した。(B) は (A)、(D) は (C) のシングルチャネル画像。Celsr1<sup>+/−</sup> マウス (A, B)、Celsr1<sup>−/−</sup> マウス (C, D)。Celsr1 変異マウスについては後述。F-アクチンより少し基底面側の上皮細胞の側面に Celsr1 は局在し (矢印)、間質にはシグナルは見られない (矢頭)。ここでは Celsr1<sup>+/−</sup> マウスは野生型と同等とみなした。Bar = 100μm

(67, 小松紘司博士) より引用。



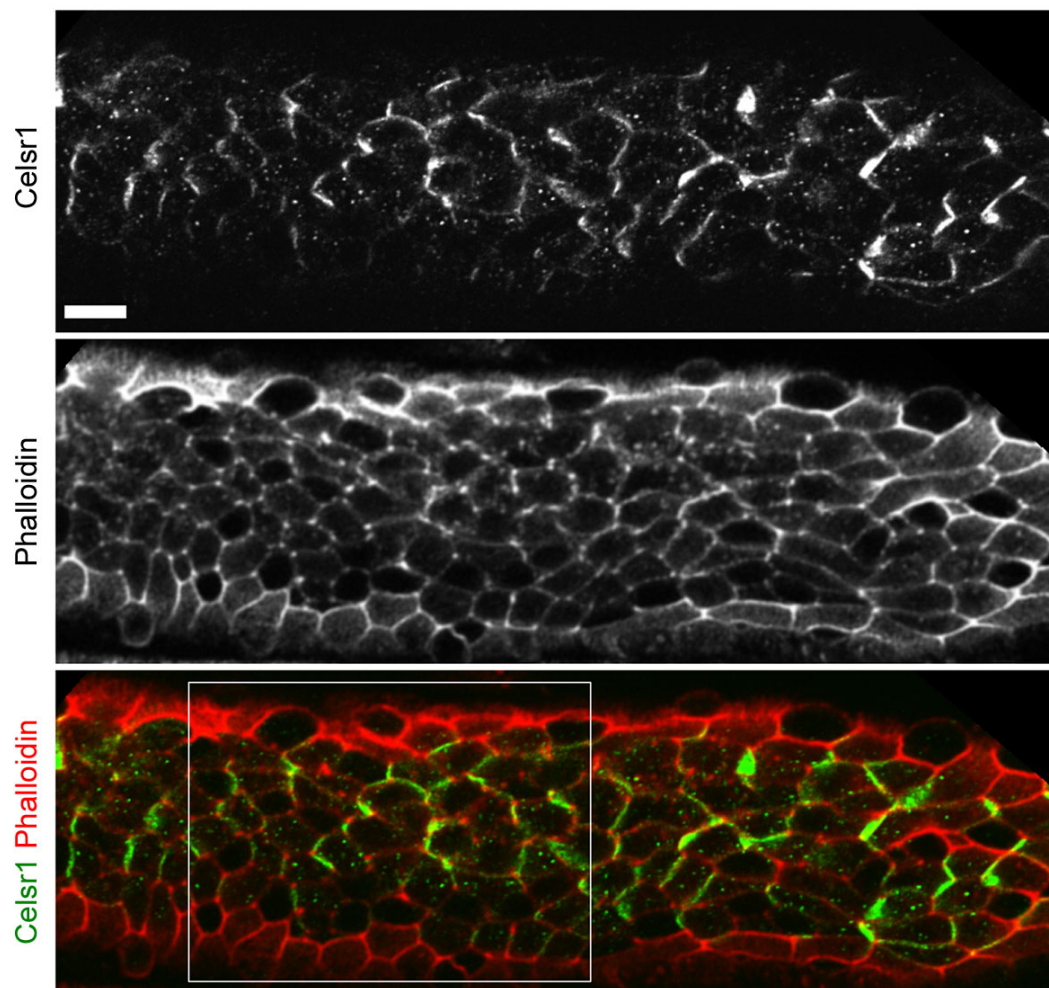


図 3.2 Celsr1 免疫染色図

L 軸に沿って開いた卵管上皮を抗 Celsr1 抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。Celsr1 は緑、F-アクチン (Phalloidin 染色) は赤で示した。左：卵巢側、右：子宮側。上皮の 3 次元的なヒダ構造のため、それぞれの上皮細胞の頂端-基部軸上の異なる位置の像が図に表されていることに留意。白枠で囲った領域を図 3.3 に示した。Bar = 10 $\mu$ m



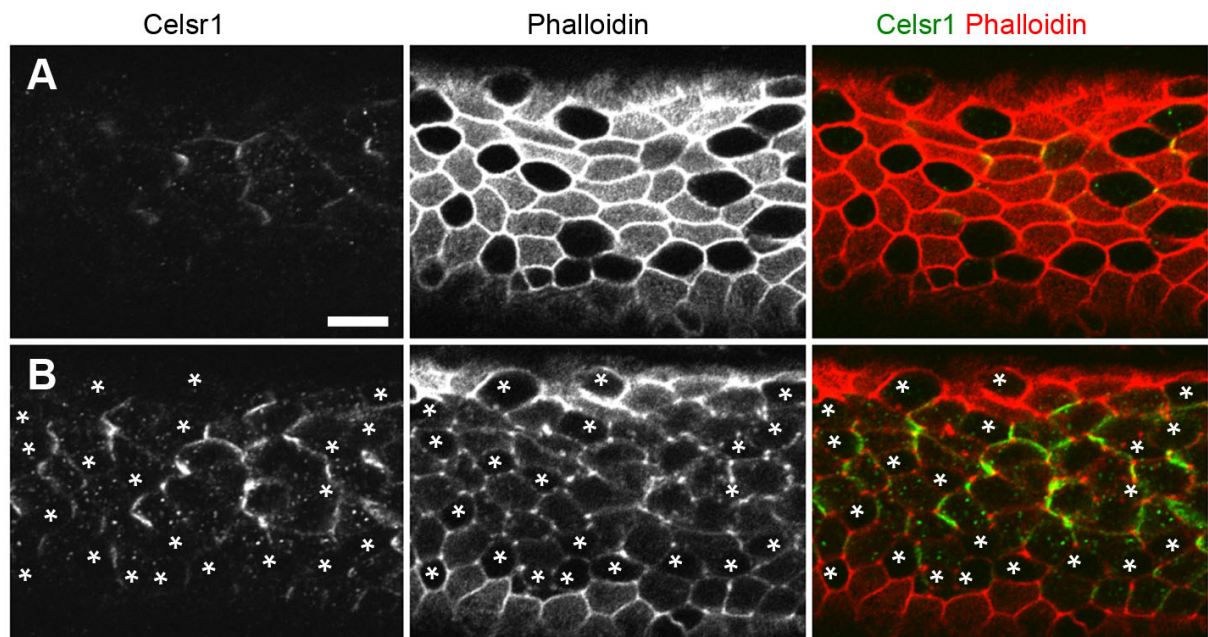


図 3.3 Celsr1 免疫染色図

(A, B)L 軸に沿って開いた卵管上皮を抗 Celsr1 抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。Celsr1 は緑、F-アクチン (Phalloidin 染色) は赤で示した。(B) の焦点面は、(A) より 2 $\mu$ m 基部側である。  
\*印は頂端面に Phalloidin シグナルを欠いた非繊毛細胞を示す。左：卵巢側、右：子宮側。上皮の 3 次元的なヒダ構造のため、それぞれの上皮細胞の頂端-基部軸上の異なる位置の像が図に表されていることに留意。Bar = 10 $\mu$ m

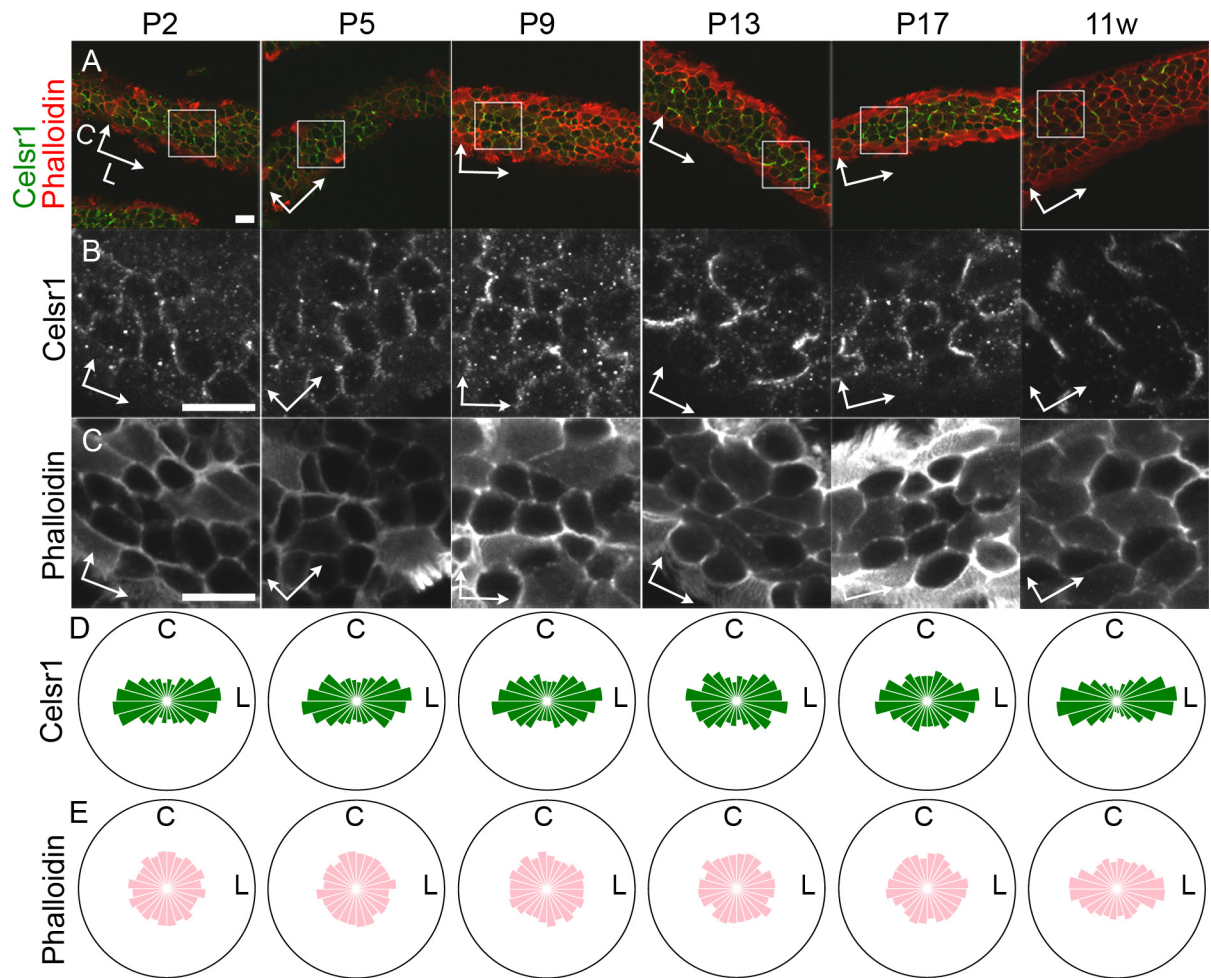


図 3.4 マウス卵管発生過程における Celsr1 タンパク質の局在

(A) Celsr1 は緑、F-アクチン (Phalloidin 染色) は赤で示した。(B, C) (A) 図の四角で示した領域の高解像度図。Celsr1 は (B)、F-アクチンは (C) に示した。L は管の伸びている方向 (Longitudinal axis)、C は輪切り断面の円周方向 (Circumferential axis) を示す。Bar = 10 $\mu$ m (D, E) 各細胞で Celsr1 シグナルおよび F-アクチンシグナルの局在の極性を定量化して角度を求め、L 軸に対する角度 (0–180°) の分布 (各角度に極性を持つ細胞の割合) を示した。定量方法は 4.7 参照。例えば、L 軸付近の角度に極性を持つ細胞では、L 軸に垂直な細胞辺に Celsr1 タンパク質が強く局在する。角度は卵巣–子宮軸 (ヒダ構造の角度によって決定) に相対的な値であることに注意。角度分布は点対称のローズダイアグラムで表した。角度は 15° 幅の 12 区分で示されている。細胞の割合は面積に比例しており、外周の円は 50% を示す。各発生ステージで解析された細胞数は 630 (P2; 出生後 2 日目)、339 (P5)、480 (P9)、170 (P13)、521 (P17)、614 (11w) である。

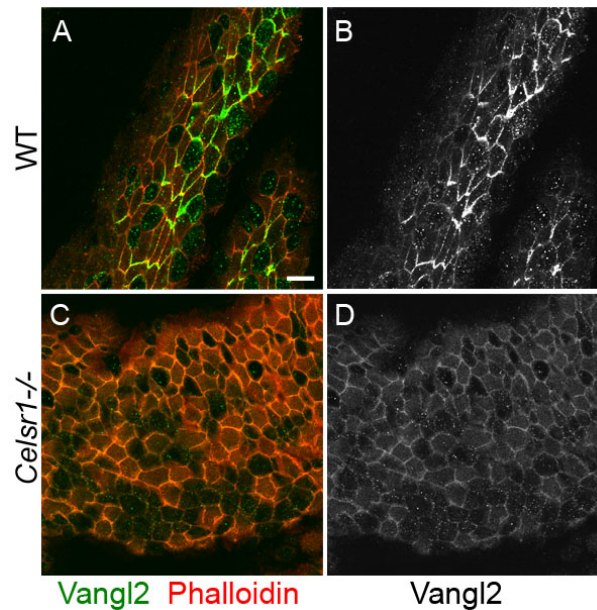


図 3.5 卵管上皮における Vangl2 の免疫染色図

(A–D) 管に沿って開いた卵管上皮の Vangl2 免疫染色図。Vangl2 は緑/白、F-アクチン (Phalloidin 染色) は赤で示した。野生型 (WT) マウス (A, B)、*Celsr1*<sup>-/-</sup> マウス (C, D)。*Celsr1* 変異マウスについては後述。Bar = 10μm

### 3.1.2 *Celsr1* は卵管上皮の繊毛運動の方向性の協調に必須である

卵管における *Celsr1* の役割を理解するため、*Celsr1* 遺伝子を欠損したホモ変異体を解析した (50)。この *Celsr1* 変異マウスでは 26 番目から 29 番目までのエクソンにあたるゲノム領域が欠損しており、体毛のパターンに異常が見られることが報告されている (50)。ホモ変異体の卵管上皮では、*Celsr1* タンパク質は検出されず、また Vangl2 タンパク質の偏った局在も見られず、PCP 経路が損なわれていることが示唆された (図 3.1C, D、図 3.5C, D)。

次に、繊毛運動の方向性を調べた。野生型のマウス卵管では、繊毛が卵管の L 軸方向に沿って運動し (図 3.6A)、卵の輸送を可能にする (本論文 2.1.4)。繊毛運動の輸送能を調べるために、蛍光ビーズを L 方向に沿って開かれた卵管の上皮の上に置いたところ、ビーズはヒダ構造に沿って子宮方向へと輸送された (図 3.6C)。繊毛運動の方向性を決定づける構造的基礎についても調べた。9+2 の微小管構造をもつ運動性繊毛では、有効打の方向と basal foot 構造 (bf) の方向性が同じであることが知られている (37)。卵管上皮を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察したところ、細胞内、あるいは細胞間で bf が同じ方向に揃えられていることが分かった (図 3.7A, A')。

*Celsr1*<sup>-/-</sup> マウスでは、多繊毛細胞の割合は、野生型と同程度であった (図 3.7C)。また、繊毛の長さも、繊毛の密度も、野生型と同程度であった (図 3.7D, E)。これらの結果から、*Celsr1*<sup>-/-</sup> マウスでは繊毛形成は正常に行われていることが示唆される。一方、繊毛運動を高速度カメラで解析したところ、多くの繊毛が卵巣–子宮軸に沿って運動していないことが分かった (図 3.6B)。次に、繊毛の輸送能力を調べた (図 3.6D)。蛍光ビーズを卵管上皮の上に置いたところ、野生型の時とは異なって、ビーズは同じ方向に向かわずにばらばらに動き、局所的に渦を巻くような動きも見られた。TEM を



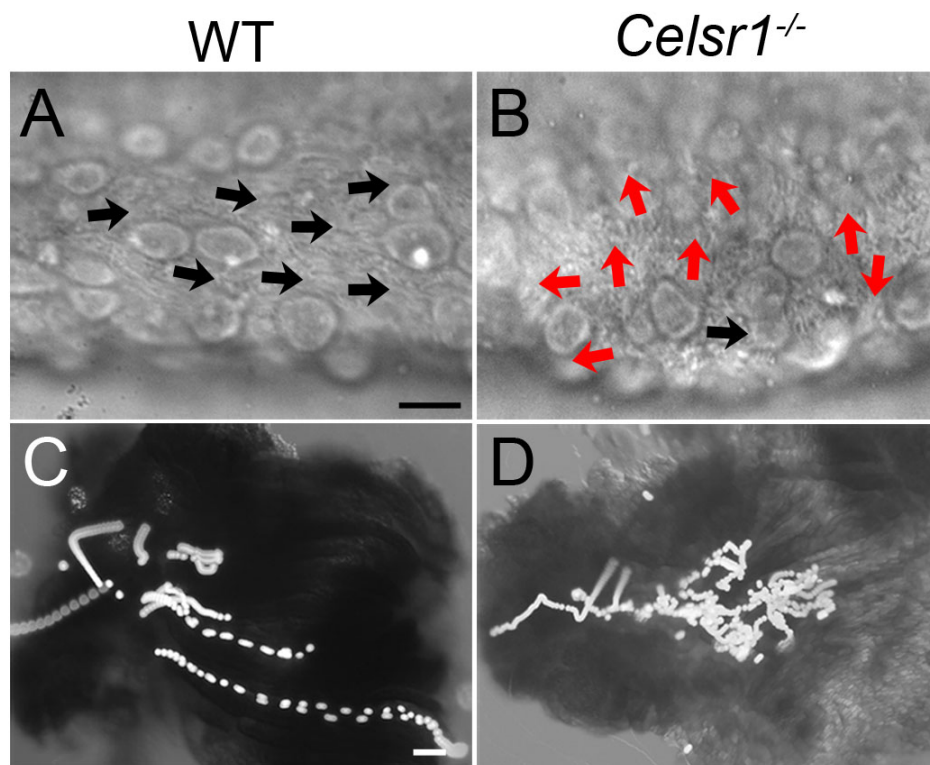


図 3.6 野生型 (WT) と *Celsr1* 変異マウスにおける卵管上皮の繊毛運動の極性

(A, B) 野生型 (A) と *Celsr1*<sup>-/-</sup> マウス (B) の卵管上皮の繊毛運動。15–17w のマウスの卵管を L 軸に沿って開き、高速度カメラを用いて繊毛運動を観察した。矢印はそれぞれの領域で観察された繊毛運動の有効打の方向を示し、赤矢印はヒダ構造の方向に沿っていない繊毛運動の方向を示す。実験はそれぞれ 4 つの卵管に対して行われた。(C, D) 野生型 (C) と *Celsr1*<sup>-/-</sup> マウス (D) の卵管上皮に蛍光ビーズを置いて、1.5 秒毎に画像を取得し、時系列の画像を重ねた。実験はそれぞれ 4 つの卵管に対して行われた。左側が卵巣側、右側が子宮側を示す。Bar = 10μm (A, B), 100μm (C, D)

用いて卵管上皮を観察すると、bf の方向が協調的ではなかった (図 3.7B)。細胞内において局所的に bf の向きが揃う場所もあったが、同一細胞内においても、細胞間においても、bf の向きは野生型と比べて乱れていた。これは円統計における分散解析によっても示唆される。*Celsr1*<sup>-/-</sup> マウス卵管上皮細胞の各細胞内での bf が向く方向の分散の平均は、野生型の分散の平均よりも高かったが、完全にランダムに向くと仮定した場合に推定される値よりも低かった (図 3.7F)。

さらに、野生型では見られた繊毛細胞の頂端面直下の細胞骨格の格子模様が、*Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異体では乱れていた (図 3.8D)。細胞骨格繊維の間隔が広がり、繊維の方向も野生型と比べて協調的ではなかった。このような細胞骨格は、マウスの気管やツメガエルの上皮において、繊毛の向きを揃える役割があることが報告されている (89,90)。

### 3.1.3 *Celsr1* 欠損は卵管上皮の形態形成に異常を引き起こす

繊毛の極性異常に加え、*Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異マウスでは組織レベルの異常も見つかった。P2 から 11w の 43 匹の *Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異マウスを観察したところ、内 21 匹は子宮の一部が狭くなったり、閉鎖した

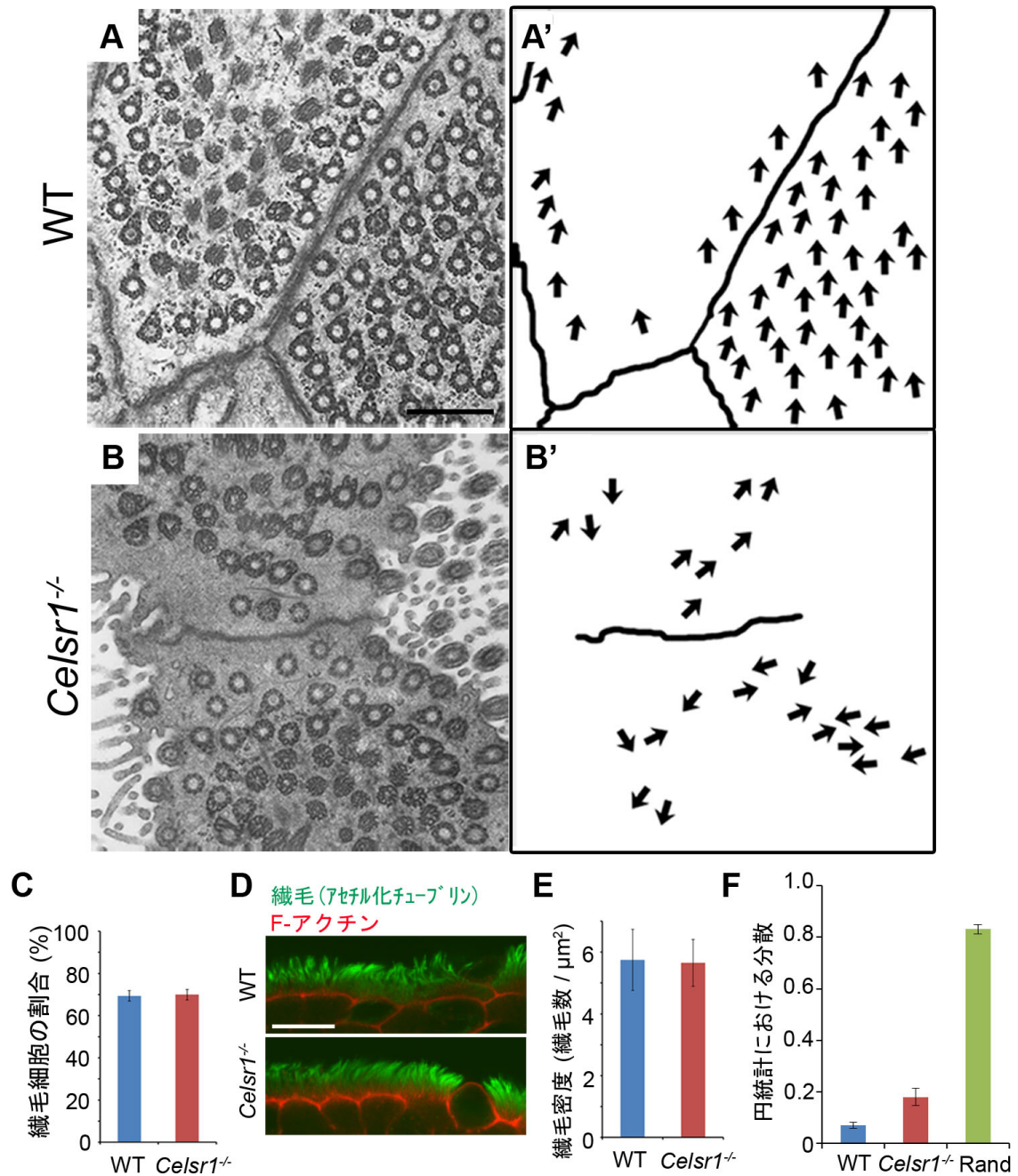


図 3.7 野生型 (WT) と *Celsr1* 変異マウスにおける卵管上皮の纖毛の表現型

(A, B) 野生型 (A) と *Celsr1*<sup>-/-</sup> マウス (B) の卵管上皮の透過型電子顕微鏡像。(A', B') 矢印は各纖毛の basal foot (bf, 円形の基底小体に付属する突起) の角度を示す。n = 各 2 卵管。上皮構造が湾曲しているため、同一切片上にある bf のみ見えている。(C) 11w マウス卵管上皮の纖毛細胞の割合。n = 各 5 匹。(D) 纖毛の共焦点顕微鏡像。(E) 電子顕微鏡像より求めた纖毛密度。n = 27 細胞 (WT)、26 細胞 (*Celsr1*<sup>-/-</sup>)。 (F) 各細胞内の basal foot の角度の円統計における分散。得られた電子顕微鏡像のうち、各細胞で 10 bf 以上が確認できた画像を解析した。n = 48 細胞 (WT)、20 細胞 (*Celsr1*<sup>-/-</sup>, Rand)。Rand は、各 bf が完全にランダムな方向を向くと仮定した場合に、*Celsr1*<sup>-/-</sup> マウスと同じ細胞数・纖毛数のデータセットをもつときに得られた推定値である。棒グラフは平均 ± 標準偏差 (C, E)、平均 ± 標準誤差 (F) を表す。

Bar = 1μm (A, B), 10μm (D)

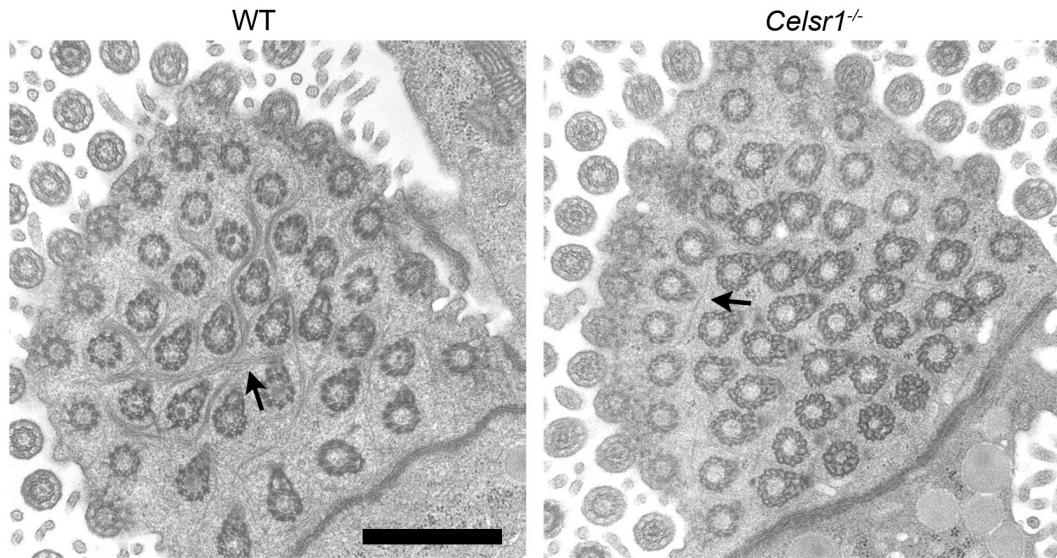


図 3.8 野生型 (WT) と *Celsr1* 変異マウスにおける細胞骨格ネットワークの表現型  
透過型電子顕微鏡でとらえた卵管上皮頂端面直下の細胞骨格ネットワーク (矢印)。Bar = 500nm

りすることが見られた (67, 小松博士)。また 43 匹中の 12 匹では卵管が途中で閉鎖していた。これらの異常は同じ個体においても、左右の生殖管において必ず同時に起こるものではなかった (67, 小松博士)。

野生型のマウス卵管上皮では、ヒダ構造が卵巣—子宮軸に沿って直線的である。一方、*Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異マウスでは、観察したすべての卵管において、この上皮のヒダ構造に異常があった (図 3.9) (67, 小松博士)。野生型では、生後直後ではヒダ構造が 1 から 2 個しかなく、成長と共にヒダの構造が増える (59)。ヒダ構造は L 軸に沿って直線的で、その大きさによらず、分岐はあまり見られない。しかし、*Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異マウスにおいては、P5 では野生型との顕著な違いは見られないものの (図 3.9B)、P9 ではヒダ構造に異常が見られた (図 3.9D, F)。 *Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異マウスの卵管では、ヒダ構造は形成されたものの、異所的な分岐が見られ、ヒダ構造は直線的ではなく湾曲し、卵管の L 軸に沿っていない。

### 3.1.4 *Celsr1* 変異体では細胞形態の極性が損なわれる

次に、上皮細胞の形態に着目し、解析を行った。Phalloidin 染色を用いて上皮細胞の頂端面の輪郭を可視化すると、野生型の成体マウスの卵管上皮では、細胞がヒダ構造に沿って伸びていることが分かった (図 3.4C, 3.10A)。そこで、出生後の発生過程に沿った細胞形態の変遷を調べた (図 3.10)。野生型では、頂端面の最長径／最短径の比の値の平均が P5 で 1.8 を超え、この時期においても、細胞は既にヒダ構造の方向に伸びており (図 3.10C, D)、極性がある。最長径／最短径の比の平均は P17 で最高の値約 2.2 をとる。調べた中のすべてのステージにおいて、細胞形態はヒダ構造の方向にそって伸びていた (図 3.10D)。これらの観察から、上皮細胞の頂端面の形態も、卵巣—子宮軸に沿って極性を持つことが分かった。一方、*Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異体では野生型と比べ、上皮細胞の頂端面は伸びておらず、より円に近い形態をとっていた (図 3.10B)。また、頂端面の長軸が向く方向と、ヒダ構造の方向との間に明確な関係は認められなかった。定量的解析の下でこれらの傾向は顕著に表れ、P13 以

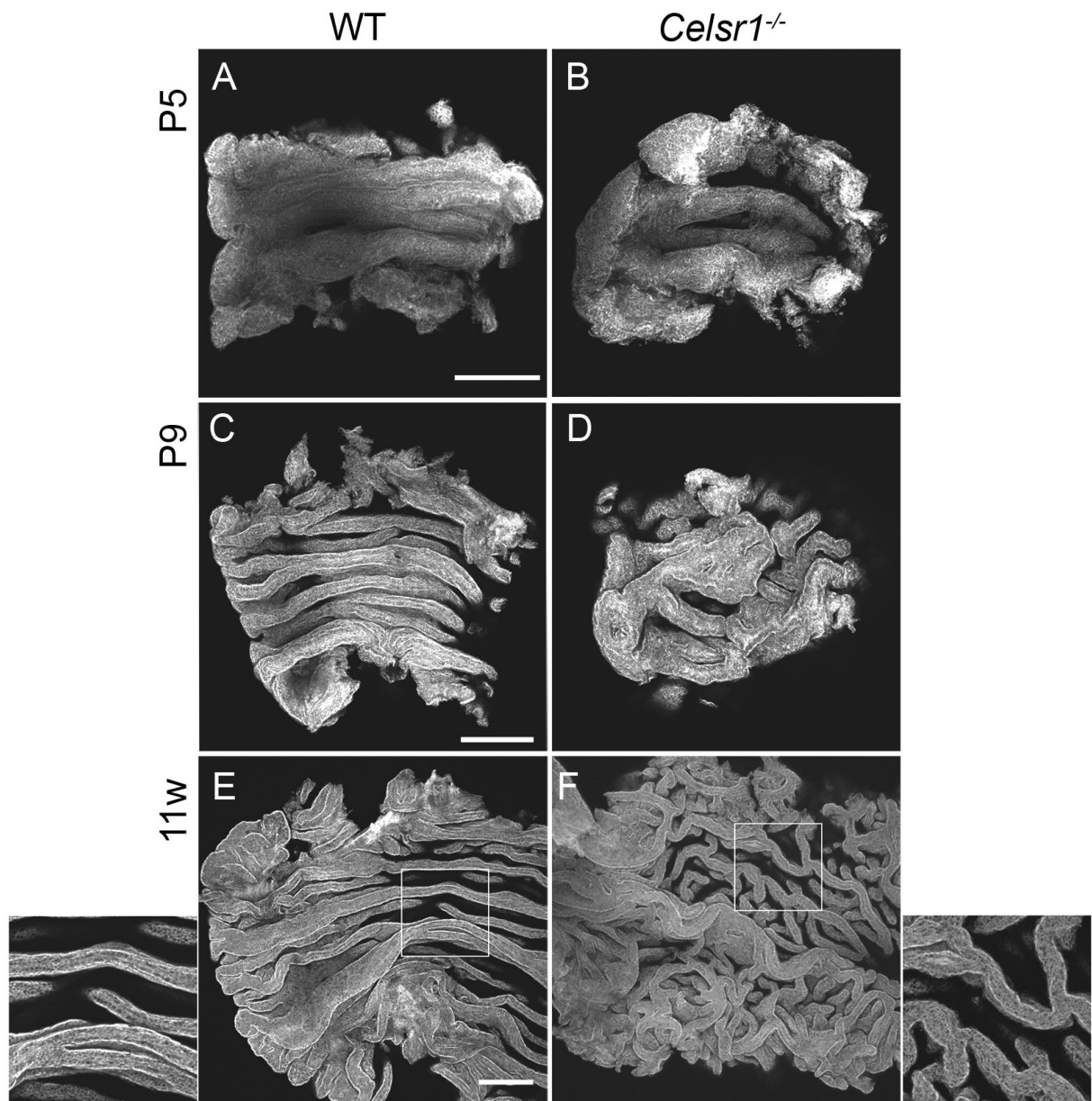


図 3.9 野生型 (WT) と *Celsr1* 変異マウスにおける卵管漏斗の発生過程

野生型 (WT) マウス (A, C, E) と、*Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異マウス (B, D, F) の卵管を、L 軸方向に沿って開いた Phalloidin 染色図。P5(出生後5日目)、P9、11w (11 週齢) の卵管組織を用いた。共焦点顕微鏡像の最大輝度投影図が示されている。(E, F) では、四角に囲まれた領域が拡大されている。Bar = 100μm

(67, 小松博士) より引用。

降では、最長径／最短径の比の値の平均が、野生型に比べ低かった (図 3.10C)。さらに、P5 から細胞の長軸が向く方向は野生型と比べて異常が見られ、ヒダ構造の方向に依らないことが分かった (図 3.10D)。これらの結果は、*Celsr1* 欠損によって、細胞形態の極性 (伸長と長軸方向) が損なわれていることを示唆した。

### 3.1.5 *Celsr1* によって直接的に制御される細胞形態

細胞形態の極性と、ヒダ構造の極性の間の関係を調べるために、核を Histone 2B-EGFP で標識した *Celsr1*<sup>-/-</sup> ES 細胞 (Embryonic Stem Cell; 胚性幹細胞)、*Celsr1*<sup>+/+</sup> ES 細胞 (対照群として) を用いてキメラマウスを作成し、モザイク解析を行った。*Celsr1*<sup>+/+</sup> クローン領域では、細胞形態においても、ヒダ構造においても、周りの野生型細胞と比べて顕著な違いは見られなかった (図 3.11)。一方、*Celsr1*<sup>-/-</sup> クローン領域では、クローン細胞の数によって、表現型が異なった。100 細胞以下程度の小さいクローンでは、細胞形態にもヒダ構造にも異常は見られなかった (図 3.12A)。1000 細胞以上の大きいクローンでは、細胞形態の極性が乱れ、ヒダ構造に異常な分岐が見られた (図 3.12D)。興味深いことに、中程度のクローンでは、ヒダ構造が直線的であるのにもかかわらず、同一のヒダに属する周りの野生型細胞に比べて、細胞形態の伸長度合が低く (図 3.12B, C)、細胞の長軸の方向もヒダ構造に沿っていなかった (図 3.12C)。間質や、卵管筋層にも *Celsr1*<sup>-/-</sup> クローン領域はあったが、これらのクローンは上皮の細胞形態やヒダ構造の形態に影響を与えなかった (未掲載データ)。このことから、上皮細胞の形態は、間質や卵管筋層の細胞の *Celsr1* タンパク質の有無に影響をされないことが示唆される。中程度の *Celsr1*<sup>-/-</sup> クローン領域で見られた、直線的なヒダ構造の中での細胞形態の異常は、細胞形態がヒダ構造によって二次的に決定されるのではなく、より一次的に *Celsr1* によって制御されていることを示唆している。

## 3.2 考察

### 3.2.1 卵管上皮の多階層にわたる極性

卵管は卵子と受精卵を輸送する生殖上重要な器官である。卵管の特徴として、多階層にわたる極性をもっており、細胞内小器官レベルの極性 (細胞内の繊毛の配向) と、組織レベルの極性 (ヒダ構造の配向) が今まで知られていた (59)。本研究では、*Celsr1* タンパク質が上皮細胞内で偏った局在を示すことと、上皮細胞が管の L 軸方向に沿って伸長していることを見出し、細胞レベルの極性を新たに発見した (図 3.13)。また、*Celsr1* 欠損マウスにおいて、これらの極性はすべて損なわれ、PCP 因子である *Celsr1* は卵管上皮の多階層にわたる極性の制御に重要な役割を果たしていることが分かった。細胞形態は、その細胞が置かれた環境の力学的影響を受けて、変形することも考えられる。しかし、*Celsr1*<sup>-/-</sup> 細胞を用いたモザイク解析により、細胞形態はヒダ構造ではなく、*Celsr1* によって一次的に制御されることが示唆された。また、ヒダ構造の異常が見られる P9 よりも前の、P5 の段階から細胞形態の異常が見られることも、この考え方に沿うものである。これらの結果から、PCP を司る *Celsr1* が多階層にわたる細胞・組織極性の形成に果たす新しい役割が明らかになった。



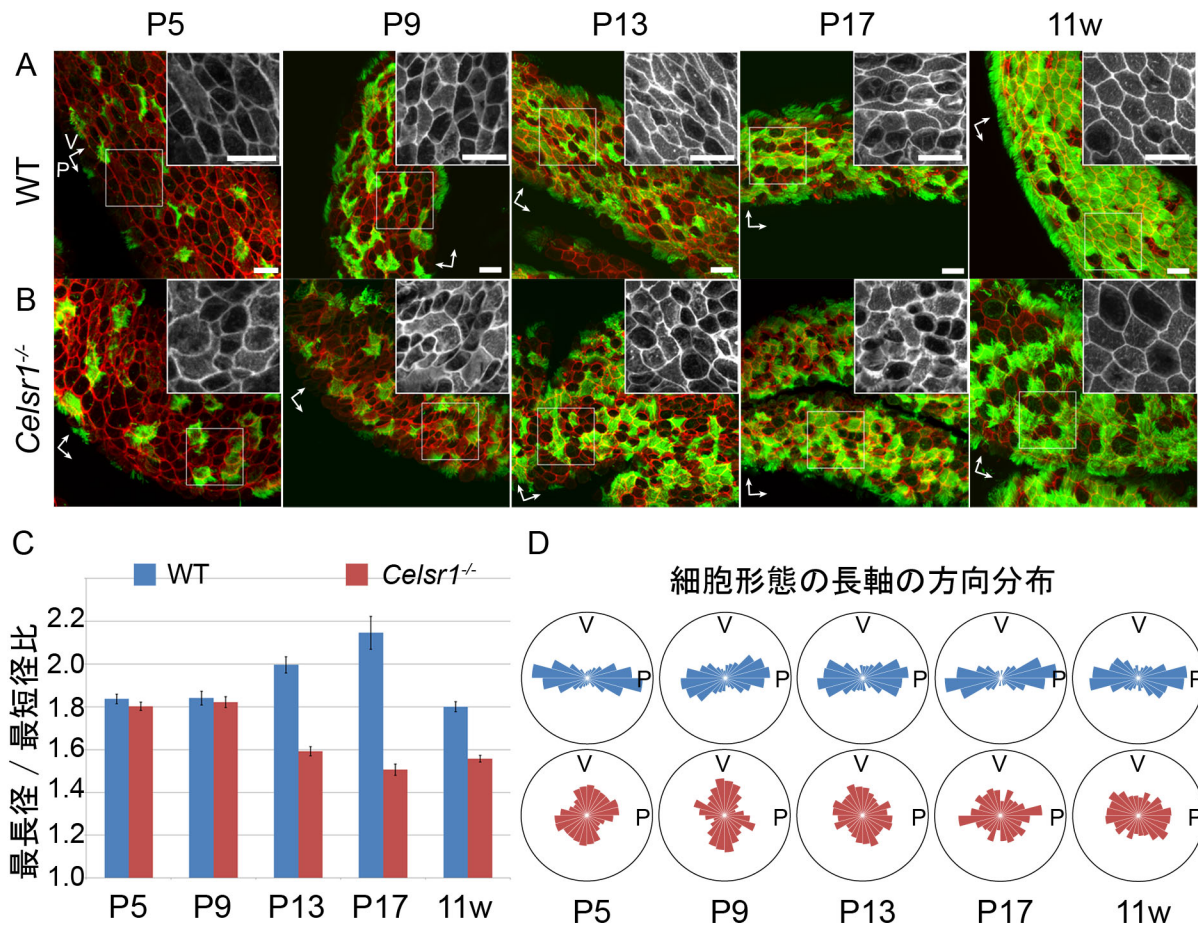


図 3.10 繊毛形成過程における細胞形態の変遷

(A, B) Phalloidin 染色 (赤) と抗アセチル化チューブリン抗体 (緑) による免疫染色図の共焦点顕微鏡像。野生型 (WT) マウス (A)、および *Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異マウス (B) の卵管上皮が用いられた。各図の右上に拡大図を示した。P はヒダ構造に平行 (parallel) な方向を示し、V はヒダ構造に垂直 (vertical) な方向を示す。最大輝度投影図を示した。Bar = 10μm (C) 各発生ステージの上皮細胞の頂端面の最長径/最短径の比。棒グラフは平均値 ± 標準誤差を示す。(D) 各発生ステージの上皮細胞の頂端面の長軸が向く方向 (major angle) の分布。P、V はそれぞれヒダ構造に平行、あるいは垂直な方向を示す。解析に用いた細胞数は P5 (581, 680; 野生型, 変異体)、P9 (438, 250)、P11 (292, 277)、P17 (131, 117)、11w (456, 501)。

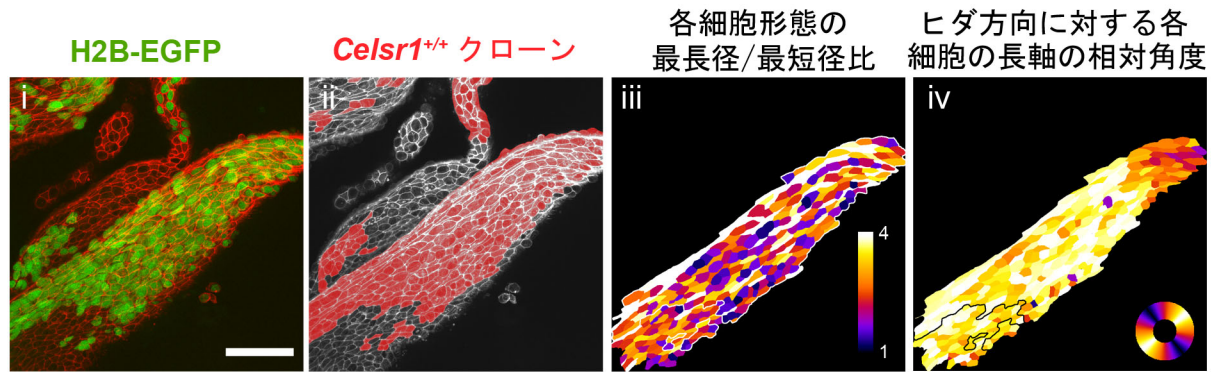


図 3.11 野生型細胞のモザイク解析における細胞形態とヒダ構造

(i, ii) 共焦点顕微鏡で得られた 3 週齢キメラマウス卵管上皮の Phalloidin 染色の最大輝度投影図。Phalloidin シグナルはそれぞれ赤 (i)、白 (ii) で示されている。野生型 (*Celsr1*<sup>+/+</sup>) 細胞クローンは Histone 2B-EGFP シグナルによって同定され (i)、赤色で示されている (ii)。間質にも GFP シグナルがあるが、(ii) では上皮細胞のクローン細胞のみが示されている。(iii, iv) 上皮細胞頂端面の細胞形態の定量的解析。各細胞の最長径/最短径比 (iii) と、ヒダ方向に対する長軸の相対的角度 (iv) の値が色で示されている。カラーコードは各図内を参照。解析した変異細胞クローンの境界が白線で示されている。図中のすべての野生型細胞クローンが解析されたわけではないことに注意。Bar = 50μm

### 3.2.2 PCP 非依存的に局所的に繊毛の極性をそろえる機構

*Celsr1* 欠損マウスでは、繊毛運動の方向は同じ向きに揃っておらず、卵管分泌液の卵巢から子宮方向への方向性を持った流れが損なわれていた (図 3.6)。その結果、切り開いた卵管上皮に載せた卵の輸送能も損なわれていた (データ非掲載)。細胞全体や隣接する細胞との間のやや広い範囲においては、各繊毛運動の方向性を示す bf の向きは揃っていなかったが、細胞内の局所的な狭い範囲では、依然 bf の向きが同じ方向に向く傾向があった (図 3.7A, B, F)。これらの結果は、*Celsr1* はやや広い範囲の繊毛極性を制御するが、局所的な狭い範囲では繊毛の極性は *Celsr1* 非依存的な機構によって制御されていることを示唆する。*Celsr1* 非依存的な機構としては、Werner らがアフリカツメガエルを用いて提唱しているアクチンや微小管などを介する機構などが考えられる (90)。

*Celsr2* もマウス卵管で発現しているが、*Celsr2* 変異マウス (7) では卵管極性の異常は見られなかった (67, 小松博士)。*Celsr3* は卵管で発現が検出できなかったことや、*Celsr1* 変異マウスでは Vangl1, 2 のタンパク質が少なく、極性をもった局在パターンも損なわれていることから、成熟した *Celsr1* 変異マウスにおいては、*Celsr1* のみならず、PCP 経路が損なわれていると考えられる。

### 3.2.3 細胞形態の制御機構

細胞形態の変化は、ダイナミックな組織形態形成において、基本的な細胞の振る舞いの一つである (91)。組織の形態形成において、細胞形態の変化が伴うことは複数報告されており (92–94)、いくつかの研究において、適切な細胞形態の制御が形態形成には必要である可能性も指摘されている (93,95)。ショウジョウバエの研究では、PCP 経路と細胞形態の極性との間の関連は少ないことが示唆されてきたが (88,96)、本研究においては、上皮細胞の頂端面側の形態が、PCP 経路によって制御されている



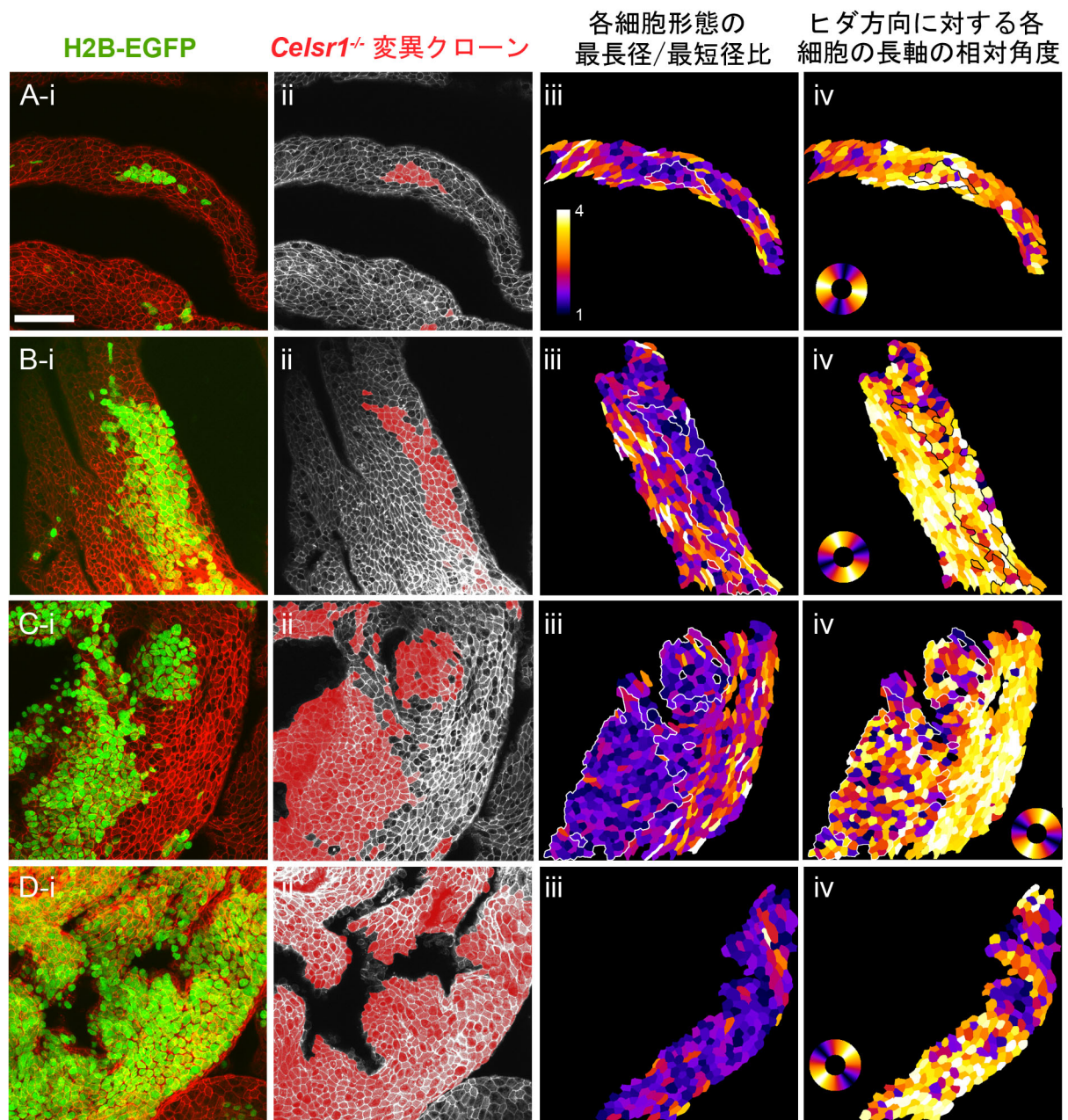
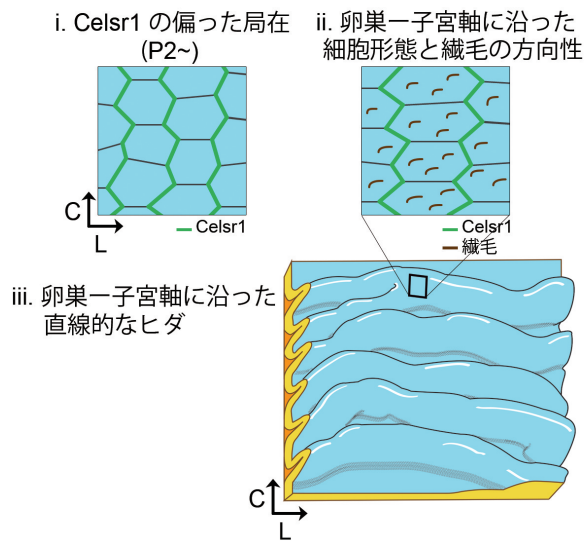


図 3.12 モザイク解析における細胞形態とヒダ構造

(A-D) 様々なサイズの *Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異細胞クローン。(i, ii) 共焦点顕微鏡で得られた3週齢キメラマウス卵管上皮のPhalloidin染色の最大輝度投影図。Phalloidinシグナルはそれぞれ赤(i)、白(ii)で示されている。*Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異細胞クローンはHistone 2B-EGFPシグナルによって同定され(i)、赤色で示されている(ii)。間質にもGFPシグナルがあるが、(ii)では上皮細胞のクローン細胞のみが示されている。(iii, iv) 上皮細胞頂端面の細胞形態の定量的解析。各細胞の最長径/最短径比(iii)と、ヒダ方向に対する長軸の相対的角度(iv)の値が色で示されている。カラーコードは各図内を参照。解析した変異細胞クローンの境界が白線で示されている。図中のすべての *Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異細胞クローンが解析されたわけではないことに注意。Bar = 50μm

### 正常な卵管の極性形成



### *Celsr1* 変異マウスでの卵管形成

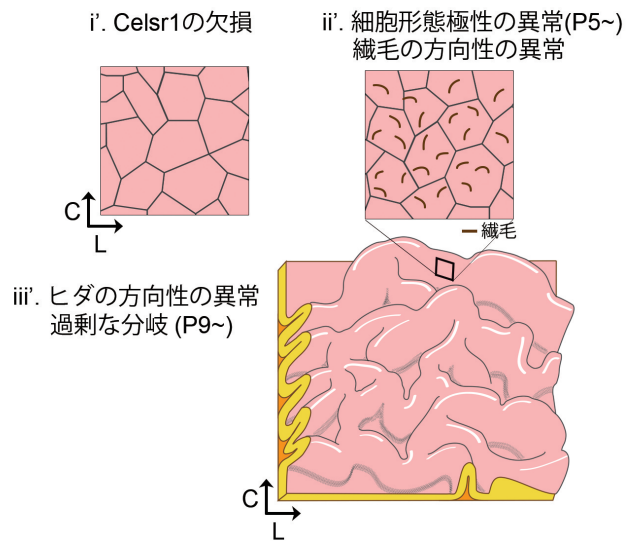


図 3.13 正常な卵管の極性形成と、*Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異マウスでの卵管形成

ことが明らかになった。興味深いことにモザイク解析においては、一部の *Celsr1* 変異クローンに隣接する野生型の細胞では、細胞形態の異常が見られた (図 3.12B-iii, C-iii)。この結果は、core モジュールに属する PCP タンパク質が、隣接する細胞間の極性を調節する性質によるものであるかもしれない (97,98)。 *Celsr1* 変異クローンと接する野生型細胞においても、細胞境界における *Celsr1* の偏った局在が部分的に乱れ、その結果野生型細胞の伸長も損なわれたと考えることができる。また、この結果は細胞非自律的に働く PCP 経路を介して、 *Celsr1* が機能していることをも示唆している。なお、Flamingo は主に細胞自律的に働くとする、ショウジョウバエの翅上皮を用いた報告もある (12)。

#### 3.2.4 三次元上皮形態の制御機構

他の組織では、PCP 経路が三次元形態を制御する一つの因子であることが知られている (99)。では、組織の形態が PCP 経路の機能によってどのように制御されているのだろうか？卵管を囲む卵管筋層の配向も、卵管上皮のヒダ構造に影響を与え得ると考えられる。例えば、腸管の絨毛突起形成において、腸管を包む筋層の配向が、上皮の折りたたみ構造の向きを決定することが報告されている (100)。卵管筋層では、円周方向に筋繊維が配向しており、この筋肉の収縮によって上皮のヒダ形成自体が促進されることは考えられるが (図 1.3B の横から押しに相当)、少なくとも *Celsr1* 変異体で見られたヒダ構造の方向性の乱れは、次に述べる理由により、筋繊維の異常によって引き起こされたものではないと本論文では結論付けた。第一に、 *Celsr1* タンパク質は上皮に発現しており、筋層では見られない。そのため、筋層において *Celsr1* は役割を果たしていないと思われる。第二に、野生型においても *Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異体においても、卵管筋層の筋繊維の配向に顕著な違いはなかった (データ非掲載)。第三に、モザイク解析において、 *Celsr1*<sup>-/-</sup> 変異細胞クローンが、間質や、筋層に見られた場合もあったが、その場合でも上皮の形態に異常は見られなかった (未掲載データ)。

細胞増殖も上皮の形態に影響を与える要因の一つと考えられる。そこで、P5 の野生型マウスと *Celsr1* 変異マウスにチミジンのアナログである BrdU (ブロモデオキシウリジン) を取り込ませた。し

かし、野生型マウスと *Celsr1* 変異マウスとの間に上皮細胞における BrdU 取り込み率は大きく違わなかった (67, 小松博士)。BrdU が取り込まれた細胞の分布パターンも、野生型と *Celsr1* 変異マウスのいずれにおいてもヒダの部位によっては異ならなかった。また、細胞分裂の角度も組織形態を制御する要因の一つと知られている (101)。そこで、核を Histone 2B-GFP で標識した P5 の野生型マウスと *Celsr1* 変異マウスを用いて、卵管を L 軸に沿って開いた状態での組織培養を行い、24 時間の経時観察を行って細胞分裂の方向を調べたが、顕著な違いは見られなかった (67, 小松博士)。これらの結果より、Celsr1 は細胞分裂方向の制御を介して上皮形態を制御しているわけではないと考えられる。

## 第4章 材料と方法

### 4.1 動物

各章で用いた各系統の変異マウスについては下の項目で述べる。第2章では4週齢以上の成熟したSlc:ICR系統(日本エスエルシー株式会社)のマウスを用いた。2.1.3では8–12週齢のメスのSlc:ICRを用いた。第3章は、図3.4ではSlc:ICR系統を用いた。その他の実験で用いたマウスの系統は図中及びキャプションに示した。

すべての動物飼育・実験は京都大学における動物実験の実施に関する規程、および大学共同利用機関法人自然科学研究機構動物実験規程に沿って行われ、京都大学動物実験委員会、および自然科学研究機構岡崎3機関動物実験委員会より承認された。動物は基礎生物学所モデル生物研究センター飼育室で12時間明、12時間暗の光条件で $22\pm1^{\circ}\text{C}$ 、SPF (Specific Pathogen Free; 特定された微生物や寄生虫が存在しない)環境で飼育された。

#### 4.1.1 変異マウス

**Celsr1 変異マウス** *Celsr1* 変異マウスはFadel Tissir 博士、André Goffinet 博士らより分与された(50)。*Celsr1*<sup>-/-</sup>マウスと比較するための野生型(WT)マウスは、*Celsr1*<sup>+/-</sup>同士の交配によって得られた*Celsr1*<sup>+/+</sup>マウスを用いた。図3.1では対照実験として*Celsr1*<sup>+/-</sup>マウスを用いたが、*Celsr1*<sup>+/-</sup>マウスと*Celsr1*<sup>+/+</sup>マウスの卵管の間には、顕著な違いは見られなかった

変異アリルは612, 615プライマー(表4.3, 以下省略)によって増幅される592bpの配列で判定し、野生型アリルは612, 613プライマーによって増幅される389bpの配列で判定した。PCRは尾より得られたDNAに対し、ポリメラーゼMightyAmp(タカラバイオ株式会社)を用いて行った。

**Rosa26 Histone-2B-EGFP ノックインマウス** Histone-2B-EGFPをRosa26プロモータ下で発現するマウスは藤森 俊彦博士らによって作出され、既に報告された系統である(102)。Rosa26ノックインアリルはPhil1, pA1プライマーによって増幅される497bpの配列で判定し、野生型アリルはPhil1, Phil3プライマーによって増幅される608bpの配列で判定した。PCRは尾より得られたDNAに対し、ポリメラーゼMightyAmp(タカラバイオ株式会社)を用いて行った。

#### 4.1.2 過排卵

採卵3日前の午後5時に5U/匹のPMS (pregnant mare's serum/妊馬血清)を、48時間後に5U/匹のhCG (human chorionic gonadotropin/ヒト絨毛性ゴナドトロピン)を腹腔内投与して過排卵処理を行った。

#### 4.1.3 性周期の判別

メスマウスの性周期は標準的なプロトコルに従い、膣垢の検査によって判別した(54)。

## 4.2 モザイク解析

### 4.2.1 ES 細胞株の樹立

*Celsr1*<sup>+/-</sup> マウスと *Celsr1*<sup>+/-</sup>; *R26-H2B-EGFP*<sup>-/-</sup> マウスとを掛け合わせ、胚盤胞より ES 細胞 (Embryonic Stem; 胚性幹細胞) 株を以前報告されている方法の改変版を用いて樹立した (103–105)。簡潔に述べると、E3.5 胚 (受精後 3.5 日目胚) を MEF (Mouse Embryonic Fibroblast; マウス胚性線維芽細胞) フィーダー細胞 (株式会社リプロセル) の上に置き、2i 培地 (ESGRO complete basal medium (Millipore) に 0.4μM PD0325901 (Cayman chemical, U.S.A.)、3μM CHIR99021 (和光純薬工業株式会社)、1000 unit/ml LIF (Leukemia Inhibitory Factor) (Millipore) を添加した培地) で培養した。4–7 日後、トリプシン処理を行い (TrypLE Express, Gibco)、離散させたのち、新しいウェルに播種し、段階的に細胞を増殖させた。

遺伝型の判定のために、一部の ES 細胞はフィーダー細胞無しで培養し、ゲノム DNA を抽出した。*Celsr1* の遺伝子型判定は 4.1 の通りに行い、性別は Y 染色体にある *Sry* 遺伝子の有無によって判別した (プライマー *Sry*-M5、*Sry*-M3)。Y 染色体を含まない *Celsr1*<sup>-/-</sup> もしくは *Celsr1*<sup>+/+</sup> ES 細胞株を選び、キメラマウスの作出に用いた。

### 4.2.2 キメラマウスの作出

キメラマウスの作出は標準的な方法に従い (106)、藤森 俊彦博士が行った。5–15 個のトリプシン処理された ES 細胞を、Jcl:MCH(ICR) 系統の胚盤胞に注入し、交配後 2.5 日後の偽妊娠マウス (ICR 系統) の子宮に戻した。*Celsr1*<sup>-/-</sup> ES 細胞を用いた実験では、6 匹のキメラマウスを作出し、200 クローン以上を含む 48 枚の画像を取得した。*Celsr1*<sup>+/+</sup> ES 細胞を用いた実験では、8 匹のキメラマウスを作出し、100 クローン以上を含む 30 枚の画像を取得した。

## 4.3 CBF 解析と卵の輸送

### 4.3.1 組織学的準備と CBF 解析のための画像取得

成熟したメスマウスを頸椎脱臼した後、采を含む卵管の漏斗部分のみを切り出して、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)、もしくは PBS; Phosphate Buffer Saline) に入れた。切り出した漏斗を管に沿って開き (図 2.1A)、カバーガラスの上に用意した 37°C PBS (-) のドロップの中に入れ、内腔に面した上皮がカバーガラスに向くようにした。組織の解剖は卵管の上皮を傷つけないよう丁寧に行われた。ドロップが乗ったカバーガラスを反転し、37°C に温めた時計皿の上に乗せ、カバーガラス越しに繊毛運動を観察した (図 2.1B)。時計皿の中には 37°C に温めた水をいれ、ドロップが乾かないようにした。1mM Ca<sup>2+</sup>・Mg<sup>2+</sup> を含む PBS (+) と DH (Dulbecco's Modified of Eagle's Medium/Ham's F12 (1:1)) も培地として用いたが、CBF に大きな影響は与えなかったため (表 2.1)、以降の実験では PBS (-) を培地として用いた。

動画は 40 倍対物レンズを装着した正立顕微鏡 (BX70, オリンパス株式会社) とデジタル高速度 CCD カメラ (HAS-220, 株式会社ディテクト) を用いて、200 フレーム/秒 (5 ミリ秒/フレーム) で 2.5 秒間撮影した (計 500 フレーム)。各フレームは 256 階調の 480 × 640 ピクセルで取得した。CBF 解析で用いられたすべての画像は漏斗を管に沿って開いてから 15 分間以内に取得された。



#### 4.3.2 画像処理と CBF 測定

画像は ImageJ (Rasband, W.S., National Institutes of Health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて処理した。繊毛運動を含む 20 ピクセル四方の領域 ( $13.7\mu\text{m}^2$  に相当) を取得された動画より選択し、OD を各フレームで計算し、時間に対する OD の関数  $\text{ODF}(t)$  (= 本文中の  $\text{OD}(t)$ ) を得た (図 1.12A)。CBF は  $\text{ODF}$  の時間軸に対するずれで求められる自己相関関数 (ACF) によって計算した。 $n$  フレームずらしたときの ACF の値は :

$$\text{ACF}(n) = \frac{1}{(500-1)\sigma^2} \sum_{t=1}^{500-n} (\text{ODF}(t) - m)(\text{ODF}(t+n) - m)$$

で求められる。ただし、 $\sigma^2 = \text{ODF}(t)(1 \leq t \leq 500)$  の分散、 $m = \text{ODF}(t)(1 \leq t \leq 500)$  の平均。 $\text{ODF}(t)$  が一定の周期で変化するとき、 $\text{ACF}(n)$  も周期的に変化する。 $\text{ACF}(n)$  が最初の極大値をとるとき、 $\text{ACF}(n) < \text{ACF}(n+1) < \text{ACF}(n+2)$  を満たす最小の  $n$  を  $n_0$  とし、最初の極大値をとるずれフレームを、 $\text{ACF}(n) > \text{ACF}(n+1) > \text{ACF}(n+2)$  を満たす最小の  $n$  ( $n_0 < n < 500$ ) を  $n_1$  とし、これらを自動的に計算した。画像は 200 フレーム/秒で取得されたため、周期を  $n_1/200$  秒、周波数を  $200/n_1(\text{Hz})$  とした。

それぞれの動画に対して 25ヶ所の ROI を選択して CBF を測定した。 $\text{ACF}(n_1) \geq 0.2$  を満たす測定では  $\text{ODF}(t)$  が周期的に変化しないことが多かったため、 $\text{ACF}(n_1) > 0.2$  を満たした測定のみを有効な測定と見なした。この閾値 (0.2) は数学的ではなく、経験的に定められた。CBF 測定の安定性を調べた実験では (図 2.3)、1 分間隔で同一視野に対して CBF 測定を 11 回行った。このときに組織がわずかに移動してずれることがあったが、同一 ROI で CBF を測定するために、ImageJ のプラグイン StackReg (107, <http://bigwww.epfl.ch/thevenaz/stackreg/>) を用いて組織のずれの影響を打ち消した。

#### 4.3.3 卵管による卵の輸送

過排卵処理した slc:ICR 系統のメスマウスより、採卵日の午後 2 時に卵丘細胞に包まれた卵 (COC) を取り出し、BSA を添加した KSOM 培地 (MR-020P, Millipore) の中に置いた。別個体の slc:ICR 系統メスマウスの卵管の漏斗を、管に沿って開いて PBS の中に入れ、COC を采の付近 (卵巣側の端) に置いた。画像は実体顕微鏡 (Leica MZ-FLIII) と AxioCam (Carl Zeiss) を用いて取得した。

#### 4.4 野生型と *Celsr1* 変異マウスの卵管上皮の繊毛運動の観察

観察は小松紘司博士によって行われた。漏斗領域を切出し、縦に開いた後、スライドガラス上にパンチラベル (ジョイントテックスカンパニー) を 3 枚重ねて貼り、パンチラベルの穴の中を PBS(-) で満たし、試料を入れた。観察したい面が上に来るよう試料を整えてカバーガラスを置いた。画像取得は 4.3.1 と同様に行った。

## 4.5 野生型と *Celsr1* 変異マウスの卵管によるビーズの輸送

卵巣-子宮軸に沿って開いた卵管を PBS 溶液の中に入れ、緑色蛍光ビーズ (FluoSpheres Polystyrene Microspheres, 15  $\mu\text{m}$ , Invitrogen, #F21010) を置き、実体顕微鏡 (MZFLIII, Leica) を通して CCD カメラ (DP72, オリンパス) で撮影した。

## 4.6 電子顕微鏡観察

電子顕微鏡を用いた観察は花市電子顕微鏡技術研究所の高瀬弘嗣さんによって行われた。卵管は固定液 (2% グルタルアルデヒド、2% PFA を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH=7.4)) に入れた後、同じ溶液の中で 2%  $\text{OsO}_4$  処理を行った。固定された試料を洗浄し、試料は段階的なエタノール処理によって脱水され、酸化プロピレンによって再構成された。試料は酸化プロピレン/エポキシ樹脂 (Quetol 812, 日新 EM) 混合溶液に浸透させ、その後エポキシ樹脂に浸透させた。続いて試料はエポキシ樹脂ブロックに包埋し、60°C で 48 時間処理して重合化させた。ウルトラミクロトーム (LTRACUT-UCT, Leica) を用いて超薄切片 (80–90 nm) を作成し、2% 酢酸ウラニルで 15 分間染色し、modified Sato's lead 溶液 (108) に 5 分間つけた後、透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX, 日本電子株式会社) を用いて観察した。

### 4.6.1 basal foot の方向の統計解析

各細胞における basal foot (bf) の向く方向の、円統計における分散値 (Circular variance)  $S^2$  (109) は、

$$S^2 = 1 - \sqrt{\left(\frac{\sum \cos \theta}{n}\right)^2 + \left(\frac{\sum \sin \theta}{n}\right)^2}$$

によって求めた。ただし、 $\theta$  は各繊毛の向く角度、 $n$  はその細胞内に含まれる bf のうち、角度が判定できた数を示す。一つの細胞内で角度が判定できた bf が 10 個以上の場合のみ分散値を計算した。比較のために bf がランダムに向くと仮定した時は、各細胞内の bf 数、細胞数を *Celsr1* 変異体と同じとした。

## 4.7 膜タンパク質の細胞境界上での分布の偏りの定量化

細胞境界に存在するタンパク質の局在の細胞境界上での分布の偏りを定量的に評価するため、Aigouy らの報告 (88) を基に、免疫染色像の画像解析を用いて極性を平尾真由美さんと共に数値化した (図 4.1)。画像の取得は小松紘司博士によって行われた。得られた免疫染色像の共焦点顕微鏡像より、頂端面付近の 3 枚の連続した光学切片 (各 0.3  $\mu\text{m}$  厚) を用いて最大輝度投射図を作成した。次に、Phalloidin のシグナルを参考にしたトレースによって、細胞輪郭の点集合の座標を蛍光シグナルの輝度と共に取得した。細胞輪郭の点集合の座標の平均を細胞の重心と見なし、座標  $(x, y)$  を重心からの極座標  $(r, \theta)$  に置き換えた。5° 間隔の区分 (例: 2.5° – 7.5°, 7.5° – 12.5° 等) を取り、それぞれの区分での蛍光シグナルの平均  $I(\theta)$  をとった (例:  $\theta = 5^\circ, 10^\circ$  等)。  $Q_1 = \sum_{\text{各区分}} I(\theta) \cos 2\theta$ ,  $Q_2 = \sum_{\text{各区分}} I(\theta) \sin 2\theta$  を計算し、極性の強さを  $P = \sqrt{Q_1^2 + Q_2^2}$ 、極性の方向を  $\phi$  とし、各細胞の重心を中心とする線で極性を表した (線長= $P$ 、角度= $\phi$ )。ただし、 $\cos 2\phi = Q_1/P$ ,  $\sin 2\phi = Q_2/P$ 。この方法に基づけば、PCP の Core モジュールに属すタンパク質が示すような、細胞内で対角線上の両端で強い局在を示す場合、

その対角線の角度を  $\phi(-90^\circ \sim 90^\circ)$  で導出する。Celsr1 抗体で免疫染色した画像を用いて Celsr1 の細胞内局在を定量化し、各細胞の重心を中心とする線で極性を表したところ (線長= $P$ 、角度= $\phi$ )、目視で判定したのと同じような結果 (極性の方向・強さ) を示した。細胞境界や纖毛のアクチン繊維を標識する Phalloidin 染色と比べて、Celsr1 の局在パターンの方が強い極性を示し、極性の方向も卵巣—子宮軸と平行方向にそろっていた (図 4.2; 表 4.1)。

本研究で用いた定量化の方法では、各細胞においての膜タンパク質の非対称な局在が示す極性の強さ  $P$  は、得られた免疫染色像のシグナルの強度に比例する。シグナルが強く、細胞内局在の非対称性が大きい細胞を強い極性を持つ細胞であると見なしているが、この方法は直感的でわかりやすい一方、シグナルの強度はサンプルに対する焦点の深さやマウントの仕方など、様々な要素の影響下にあるため、サンプル間でのシグナルの強度がばらつき、極性の強さ  $P$  をそのまま異なるサンプル間で比較することはできない。各細胞の細胞境界におけるシグナルの平均 ( $\bar{I}$ ) を用いて極性の強さ  $P$  を補正して細胞内局在の非対称性のみを極性で見なす方法や、それぞれの免疫染色像全体でシグナル強度の平均化するなどの方法などによって、極性の絶対的な定量化が可能となるかもしれない。

	角度 ( $\phi$ ) の偏差 ( $^\circ$ )	強さ ( $P$ ) の平均	シグナル強度の平均 ( $\bar{I}$ )	画像全体の極性の強さ
Celsr1	31.6	5947	976	<b>204.8</b>
Phalloidin	36.7	3506	1015	<b>64.8</b>

n=47 細胞

表 4.1 図 4.2 の画像全体の極性の特徴

角度 ( $\phi$ ) の偏差 ( $^\circ$ )=各細胞の局在の極性が示す角度の画像内での標準偏差 (角度統計ではない通常の標準偏差)。強さ ( $P$ ) の平均=各細胞の局在の極性が示す強さの画像内での平均。シグナル強度の平均=各細胞輪郭上のそれぞれのシグナル強度の平均の画像内での細胞あたりの平均。画像全体の極性の強さ= $\sqrt{(\sum_{\text{各細胞}} Q_1)^2 + (\sum_{\text{各細胞}} Q_2)^2} / \bar{I}$  で表し、この指標は細胞間での極性の方向がそろっているかどうかを表す。 $\bar{I}$  で補正することにより、Celsr1 と Phalloidin の極性の強さの比較が原理的に可能となる。

## 4.8 免疫染色

**試料の準備** 卵管組織は管に沿って開いた後、4%PFA (Paraformaldehyde) の PBS 溶液で一晩  $4^\circ\text{C}$  で固定した。組織切片作成には、組織を Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) 溶液 (サクラファインテックジャパン株式会社) に入れ、液体窒素で凍結させたのち、クライオスタット (OTF-5000, Bright Instrument, UK) を用いて作成し、4%PFA 溶液で固定した。その後 0.1% Triton X-100 の PBS 溶液 (T-PBS) で細胞膜の透過処理を 2 回行い、Blocking One (ナカライテスク株式会社) でブロッキングした。

免疫染色に用いた抗体の一覧を表 4.2 に示す。一次抗体は Blocking One を用いて希釈し、 $4^\circ\text{C}$  で一晩反応させた。0.1% T-PBS で 3 回洗浄し、二次抗体、Texas Red-X phalloidin (Molecular Probes, 1:100) および Hoechst 33258 (Molecular Probes, 1:200,000–1,000,000) を用いて室温で 1 時間染色した後、再び 0.1% T-PBS で 3 回洗浄した。

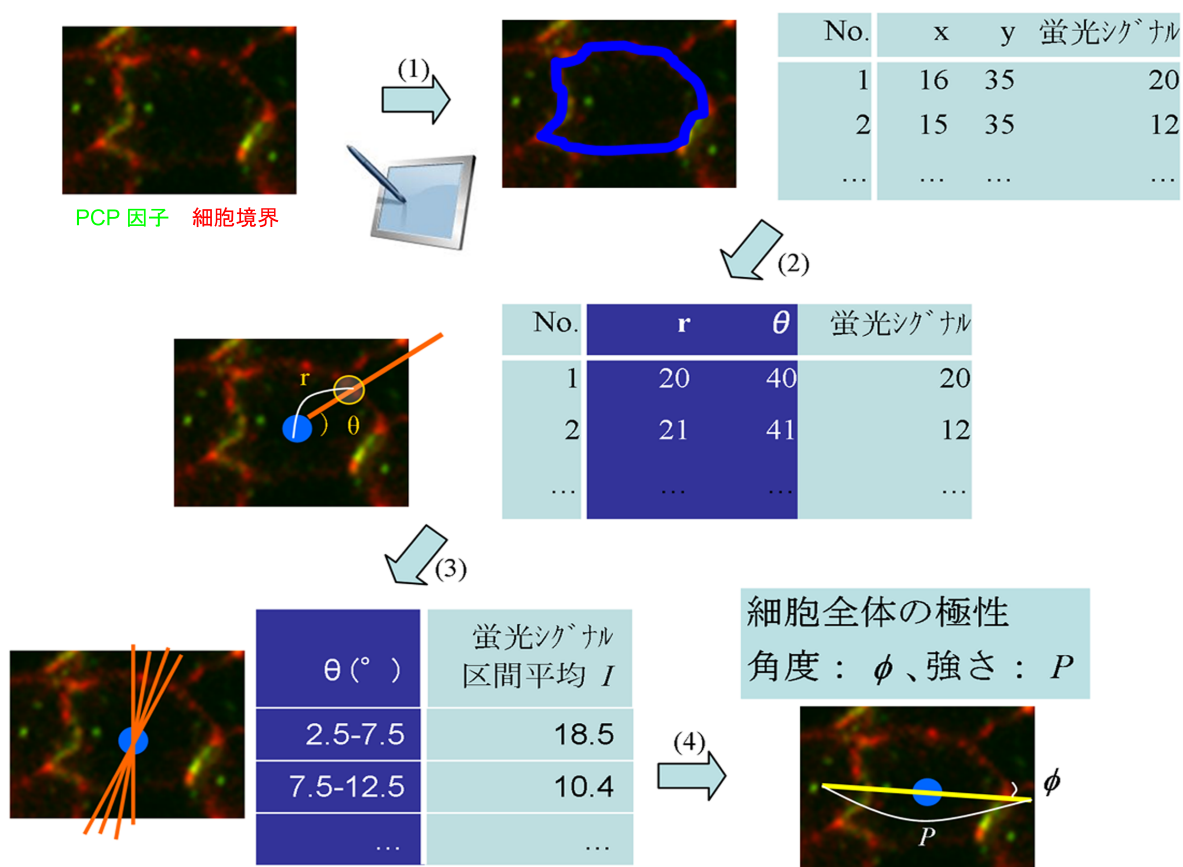


図 4.1 膜タンパク質の細胞境界上での分布の偏りの定量化

定量化の模式図：(1) Phalloidin のシグナルを参考にして細胞輪郭をなぞり、細胞輪郭の点集合の座標を蛍光シグナルの輝度と共に取得した。(2) 細胞輪郭の点集合の座標の平均を細胞の重心と見なし、座標  $(x, y)$  を重心からの極座標  $(r, \theta)$  に置き換えた。(3) 5 間隔の区分を取り、それぞれの区分での蛍光シグナルの平均  $I(\theta)$  をとった。(4)  $Q_1 = \sum_{\text{各区分}} I(\theta) \cos 2\theta$ ,  $Q_2 = \sum_{\text{各区分}} I(\theta) \sin 2\theta$  を計算し、極性の強さを  $P = \sqrt{Q_1^2 + Q_2^2}$ 、極性の方向を  $\phi$  とし、各細胞の重心を中心とする線で極性を表した (線長= $P$ 、角度= $\phi$ )。ただし、 $\cos 2\phi = Q_1/P$ ,  $\sin 2\phi = Q_2/P$ 。

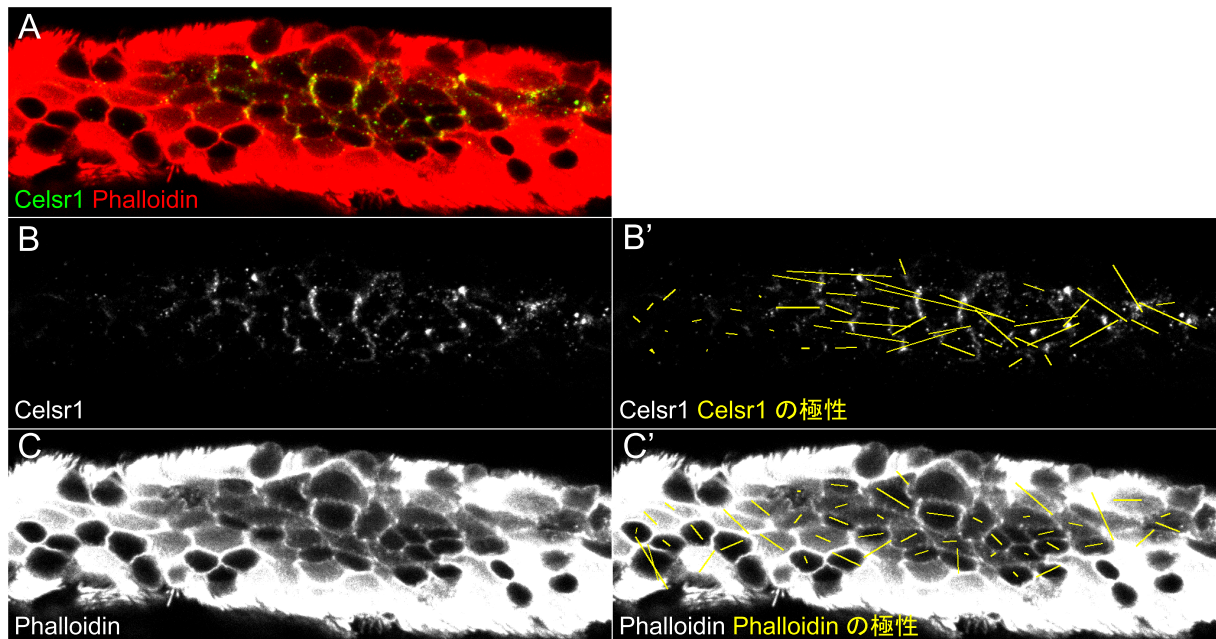


図 4.2 Celsr1 の細胞境界上での分布の偏りの定量化

(A) 解析の元となる免疫染色像。(B, B') Celsr1 のシグナルに対して行った極性の定量化 (中段)。(C, C') Phalloidin のシグナルに対してもコントロールとして解析を行った。

**観察** 組織を観察する際は、スライドグラス上にパンチラベル (ジョイントテックスカンパニー) を 3 枚重ねて貼り、パンチラベルの穴の中をマウント溶液 (Fluoromount-G, SouthernBiotech) で満たし、試料を入れた。観察したい面が上に来るよう試料を整えてカバーグラスを置いて封入した。観察は TCS SP2 (Leica)、FV-1000 (オリンパス株式会社)、A1 (株式会社ニコン) の共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

#### 4.9 細胞形態の定量化

画像取得は小松紘司博士によって行われた。共焦点顕微鏡で得られた Phalloidin 染色像の頂端面の細胞の輪郭を手動でトレースし、ImageJ で平尾真由美さんと共に解析した。各細胞の最長径/最短径は ImageJ 内の Feret's diameter / MiniFeret、長軸の方向は major angle (Fit Ellipse) の値を用いた。角度の値は、ヒダの方向が  $0^\circ$  になるように調整した。ローズダイアグラムは R の circular パッケージを用いて描いた。他の図は独自の ImageJ マクロを用いて描いた。

#### 4.10 分子生物学的手法

##### 4.10.1 RT-PCR

**卵管組織の RT-PCR** 主に、小松博士によって行われた。成熟した Slc:ICR 系統のメスマウスから卵管、脳、肺の組織を摘出して液体窒素で凍結した。RNeasy Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出して、DNase 処理後、1 $\mu$ g total RNA から、SuperScript II または III (Invitrogen) を用いて cDNA 合成を行った。得られた cDNA に対して各遺伝子のプライマーで PCR を行い増幅の有無を調

抗体名	種類	販売／分与元	使用希釈倍率
一次抗体			
Celsr1	モルモット	Polyclonal Dr. Fuchs <sup>27)</sup>	1:100-200
Celsr1	モルモット	Polyclonal 本研究	1:100-200
Vangl1	ウサギ	Polyclonal Sigma-Aldrich #HPA025235	1:500-1:1000
Vangl2	ウサギ	Polyclonal Dr. Montcouquiol <sup>110)</sup>	1:500
Vangl2	ウサギ	Polyclonal 本研究	1:400
Acetylated- $\alpha$ -Tubulin	マウス	Monoclonal Sigma-Aldrich #T7451	1:500-1000
二次抗体			
Alexa-conjugated 各種抗体		Molecular Probes	1:500

表 4.2 免疫染色で使用した抗体

べた (表 4.3)。PCR の条件は Vangl1 以外は  $94^{\circ}\text{C} \cdot 5$  分間、 $(95^{\circ}\text{C} \cdot 20$  秒間、 $6^{\circ}\text{C} \cdot 30$  秒間、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 30$  秒間)  $\times 35$  回、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 10$  分間で、Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) を用いた。Vangl1 の PCR の条件は、 $94^{\circ}\text{C} \cdot 5$  分間、 $(94^{\circ}\text{C} \cdot 30$  秒間、 $55^{\circ}\text{C} \cdot 30$  秒間、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 60$  秒間)  $\times 35$  回、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 7$  分間で、ExTaq (タカラバイオ株式会社) を用いて行った。

#### 4.11 ソフトウェア

画像処理は各顕微鏡付属のソフトウェアに加え、ImageJ、Irfanview (Irfan Skiljan, <http://www.irfanview.com/>)、Photoshop (Adobe) を用いて行った。自己相関解析、および膜タンパク質の極性の定量化の演算は Excel VBA (Microsoft) によって行われた。角度統計を含むグラフ表示・解析には R を用いた。プライマーの設計は Primer3plus (113) を用いた。模式図の作製には Draw (Openoffice.org)、Illustrator (Adobe)、Powerpoint (Microsoft) を用いた。論文執筆は L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X を使用し、miki-base、masterthesis (同志社大学理工学部インテリジェント情報工学科知的システムデザイン研究室 <http://mikilab.doshisha.ac.jp/dia/seminar/latex/>) を改変したパッケージを用いた。

プライマー名	配列 (5'-3')	増幅サイズ (bp)	用途
Vangl1-F	AGAACAAGAGAAAGACACAAATCAC <sup>111)</sup>	601	RT-PCR
Vangl1-R	CTGCGTATTGCACGATGTCC <sup>111)</sup>	-	RT-PCR
Vangl2-F	GCTGGACAATGAGTCCACGA	407	RT-PCR
Vangl2-R	ACAAGCACCATGAGCAGAGC	-	RT-PCR
Celsr1-F	TCTCAGAGGAACTTCTGCGATG	204	RT-PCR
Celsr1-R	CAGGTACCAAGGCACAGAGATG	-	RT-PCR
Celsr2-F	CTGGATGCAGCCAACAAGAG	178	RT-PCR
Celsr2-R	CCAGGCGCACTACAGAGATG	-	RT-PCR
Dvl1-F	TTGCCAGACTCAGGACTGGA	246	RT-PCR
Dvl1-R	TGCGAGGTTACTGCACAGGT	-	RT-PCR
Dvl2-F	TGTAGGCGAGACGAAGGTGA	248	RT-PCR
Dvl2-R	CTGACGACACAAGCCAGGAG	-	RT-PCR
Pk2-F	CACCGTCTGCAATGAGCTTC	171	RT-PCR
Pk2-R	TGTCTCATGTGCCAGTGTCA	-	RT-PCR
Pk3-F	AAGAGTTGCGAGCCTTCAGC	450	RT-PCR
Pk3-R	CCTCATAGCAGGCACAGCAG	-	RT-PCR
Fz1-F	GGTGGTGTGCAACGACAAGT	327	RT-PCR
Fz1-R	AGTGCGTCCACGTTGTTGAG	-	RT-PCR
Fz2-F	CCTCACATGGTCGGTGTGTGT	187	RT-PCR
Fz2-R	GAAGCGCTCATTGCATACCA	-	RT-PCR
Fz3-F	TGGCTGTGAGCTGGATTGTC	324	RT-PCR
Fz3-R	CGCTATAGGCACGCTGACAC	-	RT-PCR
Fz6-F	TTGTCACCAGTACCGCATCC	222	RT-PCR
Fz6-R	CAGGACTCTTGACGACTCG	-	RT-PCR
Fz8-F	CCGAATCCGTTTCAGTCATCA	153	RT-PCR
Fz8-R	GGTCGGTTGTGCTGCTCATA	-	RT-PCR
Ptk7-F	AGTCGTGGACAAGCCAGTGA	240	RT-PCR
Ptk7-R	GATGGCTGACCATTCTGCAA	-	RT-PCR
GAPDH-F	TGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTG	446	RT-PCR
GAPDH-R	TGAGGTCCACCACCTGTTGCTGTAG	-	RT-PCR
612	GAAAGAGACTGTTGGTGAGC	-	<i>Celsr1</i> マウス遺伝子型判定
615	CTCTGTTGACTTCTGACTGG	-	<i>Celsr1</i> マウス遺伝子型判定
613	CCACTCTGCTAACGGTAGG	-	<i>Celsr1</i> マウス遺伝子型判定
Phil1	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	-	H2B-EGFP マウス遺伝子型判定
pA1	AAGGGGGAGGATTGGGAAGACA	-	H2B-EGFP マウス遺伝子型判定
Phil3	GGAGCGGGAGAAATGGATATG	-	H2B-EGFP マウス遺伝子型判定
Sry-M5	GTGGTGAGAGGCACAAGTTGGC <sup>112)</sup>	147	Sry の遺伝子型判定
Sry-M3	CTGTGTAGGATCTTCAATCTCT <sup>112)</sup>	-	Sry の遺伝子型判定

表 4.3 本研究で用いたプライマー一覧



## 参考文献

- 1) Yingzi Yang, editor. *Planar Cell Polarity During Development*. Academic Press, 2012.
- 2) P. N. Adler. Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Developmental Cell*, Vol. 2, No. 5, pp. 525–535, 2002.
- 3) P.A. Lawrence. Gradients in the insect segment: the orientation of hairs in the milkweed bug *oncopeltus fasciatus*. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 44, pp. 607–620, 1966.
- 4) Y. S. Wang and J. Nathans. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development*, Vol. 134, No. 4, pp. 647–658, 2007.
- 5) J. A. Zallen. Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell*, Vol. 129, No. 6, pp. 1051–1063, 2007.
- 6) Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, USA and Abingdon, UK, 5th edition, 2008.
- 7) F. Tissir, Y. B. Qu, M. Montcouquiol, L. B. Zhou, K. Komatsu, D. Shi, T. Fujimori, J. Labeau, D. Tyteca, P. Courtoy, Y. Poumay, T. Uemura, and A. M. Goffinet. Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nature Neuroscience*, Vol. 13, No. 6, pp. 700–707, 2010.
- 8) P. A. Lawrence, G. Struhl, and J. Casal. Planar cell polarity: one or two pathways? *Nature Reviews Genetics*, Vol. 8, No. 7, pp. 555–563, 2007.
- 9) J. D. Axelrod. Progress and challenges in understanding planar cell polarity signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Vol. 20, No. 8, pp. 964–971, 2009.
- 10) E. K. Vladar, D. Antic, and J. D. Axelrod. Planar cell polarity signaling: the developing cell’s compass. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 1, No. 3, p. a002964, 2009.
- 11) D. R. Tree, D. Ma, and J. D. Axelrod. A three-tiered mechanism for regulation of planar cell polarity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Vol. 13, No. 3, pp. 217–224, 2002.
- 12) T. Usui, Y. Shima, Y. Shimada, S. Hirano, R. W. Burgess, T. L. Schwarz, M. Takeichi, and T. Uemura. Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of frizzled. *Cell*, Vol. 98, No. 5, pp. 585–595, 1999.

- 13) H. Matakatsu and S. S. Blair. Interactions between Fat and Dachshous and the regulation of planar cell polarity in the Drosophila wing. *Development*, Vol. 131, No. 15, pp. 3785–3794, 2004.
- 14) Y. Shimada, S. Yonemura, H. Ohkura, D. Strutt, and T. Uemura. Polarized transport of Frizzled along the planar microtubule arrays in Drosophila wing epithelium. *Developmental Cell*, Vol. 10, No. 2, pp. 209–222, 2006.
- 15) A. L. Brittle, A. Repiso, J. Casal, P. A. Lawrence, and D. Strutt. Four-jointed modulates growth and planar polarity by reducing the affinity of dachshous for fat. *Current Biology*, Vol. 20, No. 9, pp. 803–810, 2010.
- 16) Y. Feng and K. D. Irvine. Processing and phosphorylation of the Fat receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 106, No. 29, pp. 11989–11994, 2009.
- 17) H. O. Ishikawa, H. Takeuchi, R. S. Haltiwanger, and K. D. Irvine. Four-jointed is a Golgi kinase that phosphorylates a subset of cadherin domains. *Science*, Vol. 321, No. 5887, pp. 401–404, 2008.
- 18) M. A. Simon, A. Xu, H. O. Ishikawa, and K. D. Irvine. Modulation of fat:dachshous binding by the cadherin domain kinase four-jointed. *Current Biology*, Vol. 20, No. 9, pp. 811–817, 2010.
- 19) R. Sopko, E. Silva, L. Clayton, L. Gardano, M. Barrios-Rodiles, J. Wrana, X. Varelas, N. I. Arbouzova, S. Shaw, S. Saburi, H. Matakatsu, S. Blair, and H. McNeill. Phosphorylation of the tumor suppressor fat is regulated by its ligand Dachshous and the kinase discs overgrown. *Current Biology*, Vol. 19, No. 13, pp. 1112–1117, 2009.
- 20) T. Harumoto, M. Ito, Y. Shimada, T. J. Kobayashi, H. R. Ueda, B. Lu, and T. Uemura. Atypical cadherins Dachshous and Fat control dynamics of noncentrosomal microtubules in planar cell polarity. *Developmental Cell*, Vol. 19, No. 3, pp. 389–401, 2010.
- 21) D. I. Strutt, U. Weber, and M. Mlodzik. The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature*, Vol. 387, No. 6630, pp. 292–295, 1997.
- 22) C. G. Winter, B. Wang, A. Ballew, A. Royou, R. Karess, J. D. Axelrod, and L. Luo. Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell*, Vol. 105, No. 1, pp. 81–91, 2001.
- 23) S. Collier and D. Gubb. Drosophila tissue polarity requires the cell-autonomous activity of the fuzzy gene, which encodes a novel transmembrane protein. *Development*, Vol. 124, No. 20, pp. 4029–4037, 1997.

- 24) W. J. Park, J. C. Liu, E. J. Sharp, and P. N. Adler. The *Drosophila* tissue polarity gene *inturned* acts cell autonomously and encodes a novel protein. *Development*, Vol. 122, No. 3, pp. 961–969, 1996.
- 25) M. Kelly and P. Chen. Shaping the mammalian auditory sensory organ by the planar cell polarity pathway. *The International Journal of Developmental Biology*, Vol. 51, No. 6-7, pp. 535–547, 2007.
- 26) P. C. Rida and P. Chen. Line up and listen: Planar cell polarity regulation in the mammalian inner ear. *Semin Cell Dev Biol*, Vol. 20, No. 8, pp. 978–985, 2009.
- 27) D. Devenport and E. Fuchs. Planar polarization in embryonic epidermis orchestrates global asymmetric morphogenesis of hair follicles. *Nature Cell Biology*, Vol. 10, No. 11, pp. 1257–1268, 2008.
- 28) E. K. Vladar, R. D. Bayly, A. M. Sangoram, M. P. Scott, and J. D. Axelrod. Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia. *Current Biology*, Vol. 22, No. 23, pp. 2203–2212, 2012.
- 29) Y. Hirota, A. Meunier, S. Huang, T. Shimozaawa, O. Yamada, Y. S. Kida, M. Inoue, T. Ito, H. Kato, M. Sakaguchi, T. Sunabori, M. A. Nakaya, S. Nonaka, T. Ogura, H. Higuchi, H. Okano, N. Spassky, and K. Sawamoto. Planar polarity of multiciliated ependymal cells involves the anterior migration of basal bodies regulated by non-muscle myosin ii. *Development*, Vol. 137, No. 18, pp. 3037–3046, 2010.
- 30) B. Guirao, A. Meunier, S. Mortaud, A. Aguilar, J. M. Corsi, L. Strehl, Y. Hirota, A. Desoeuvre, C. Boutin, Y. G. Han, Z. Mirzadeh, H. Cremer, M. Montcouquiol, K. Sawamoto, and N. Spassky. Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nature Cell Biology*, Vol. 12, No. 4, pp. 341–350, 2010.
- 31) M. Hashimoto, K. Shinohara, J. B. Wang, S. Ikeuchi, S. Yoshida, C. Meno, S. Nonaka, S. Takada, K. Hatta, A. Wynshaw-Boris, and H. Hamada. Planar polarization of node cells determines the rotational axis of node cilia. *Nature Cell Biology*, Vol. 12, No. 2, pp. 170–176, 2010.
- 32) Dragana Antic, Jennifer L. Stubbs, Kaye Suyama, Chris Kintner, Matthew P. Scott, and Jeffrey D. Axelrod. Planar cell polarity enables posterior localization of nodal cilia and left-right axis determination during mouse and xenopus embryogenesis. *PLOS ONE*, Vol. 5, No. 2, p. e8999, 2010.
- 33) H. Song, J. X. Hu, W. Chen, G. Elliott, P. Andre, B. Gao, and Y. Z. Yang. Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning. *Nature*, Vol. 466, No. 7304, pp. 378–382, 2010.

- 34) J. A. Curtin, E. Quint, V. Tsipouri, R. M. Arkell, B. Cattanach, A. J. Copp, D. J. Henderson, N. Spurr, P. Stanier, E. M. Fisher, P. M. Nolan, K. P. Steel, S. D. M. Brown, I. C. Gray, and J. N. Murdoch. Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Current Biology*, Vol. 13, No. 13, pp. 1129–1133, 2003.
- 35) S. P. Sorokin. Centriole formation and ciliogenesis. *Aspen Emphysema Conference*, Vol. 11, pp. 213–216, 1968.
- 36) E. K. Vladar and J. D. Axelrod. Dishevelled links basal body docking and orientation in ciliated epithelial cells. *Trends in Cell Biology*, Vol. 18, No. 11, pp. 517–520, 2008.
- 37) I. R. Gibbons. The relationship between the fine structure and direction of beat in gill cilia of a lamellibranch mollusc. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, Vol. 11, pp. 179–205, 1961.
- 38) B. Mitchell, R. Jacobs, J. Li, S. Chien, and C. Kintner. A positive feedback mechanism governs the polarity and motion of motile cilia. *Nature*, Vol. 447, No. 7140, pp. 97–101, 2007.
- 39) E. Boisvieux-Ulrich, M. C. Laine, and D. Sandoz. The orientation of ciliary basal bodies in quail oviduct is related to the ciliary beating cycle commencement. *Biology of the Cell*, Vol. 55, No. 1-2, pp. 147–150, 1985.
- 40) B. Mitchell, J. L. Stubbs, F. Huisman, P. Taborek, C. Yu, and C. Kintner. The *pcp* pathway instructs the planar orientation of ciliated cells in the *xenopus* larval skin. *Current Biology*, Vol. 19, No. 11, pp. 924–929, 2009.
- 41) J. Chae, M. J. Kim, J. H. Goo, S. Collier, D. Gubb, J. Charlton, P. N. Adler, and W. J. Park. The *drosophila* tissue polarity gene *starry night* encodes a member of the protocadherin family. *Development*, Vol. 126, No. 23, pp. 5421–5429, 1999.
- 42) Masatoshi Takeichi. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 8, No. 1, pp. 11–20, 2006.
- 43) Hiroshi Kimura, Tadao Usui, Asako Tsubouchi, and Tadashi Uemura. Potential dual molecular interaction of the *Drosophila* 7-pass transmembrane cadherin *flamingo* in dendritic morphogenesis. *Journal of cell science*, Vol. 119, No. 6, pp. 1118–1129, 2006.
- 44) Daisuke Matsubara, Shin-ya Horiuchi, Kohei Shimono, Tadao Usui, and Tadashi Uemura. The seven-pass transmembrane cadherin *Flamingo* controls dendritic self-avoidance via its binding to a LIM domain protein, *Espinas*, in *Drosophila* sensory neurons. *Genes & Development*, Vol. 25, No. 18, pp. 1982–1996, 2011.

- 45) C. J. Formstone and P. F. R. Little. The flamingo-related mouse Celsr family (Celsr1-3) genes exhibit distinct patterns of expression during embryonic development. *Mechanisms of Development*, Vol. 109, No. 1, pp. 91–94, 2001.
- 46) A. K. Hadjantonakis, W. J. Sheward, A. J. Harmar, L. deGalan, J. M. N. Hoovers, and P. F. R. Little. Celsr1, a neural-specific gene encoding an unusual seven-pass transmembrane receptor, maps to mouse chromosome 15 and human chromosome 22qter. *Genomics*, Vol. 45, No. 1, pp. 97–104, 1997.
- 47) Yasuyuki Shima, Neal G Copeland, Debra J Gilbert, Nancy A Jenkins, Osamu Chisaka, Masatoshi Takeichi, and Tadashi Uemura. Differential expression of the seven-pass transmembrane cadherin genes Celsr1-3 and distribution of the Celsr2 protein during mouse development. *Developmental Dynamics*, Vol. 223, No. 3, pp. 321–332, 2002.
- 48) Yasuyuki Shima, Mineko Kengaku, Tomoo Hirano, Masatoshi Takeichi, and Tadashi Uemura. Regulation of dendritic maintenance and growth by a mammalian 7-pass transmembrane cadherin. *Developmental Cell*, Vol. 7, No. 2, pp. 205–216, 2004.
- 49) Yasuyuki Shima, Shin-ya Kawaguchi, Kazuyoshi Kosaka, Manabu Nakayama, Mikio Hoshino, Yoichi Nabeshima, Tomoo Hirano, and Tadashi Uemura. Opposing roles in neurite growth control by two seven-pass transmembrane cadherins. *Nature Neuroscience*, Vol. 10, No. 8, pp. 963–969, 2007.
- 50) A. Ravni, Y. Qu, A. M. Goffinet, and F. Tissir. Planar cell polarity cadherin Celsr1 regulates skin hair patterning in the mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 129, No. 10, pp. 2507–2509, 2009.
- 51) Laura L Yates, Carsten Schnatwinkel, Jennifer N Murdoch, Debora Bogani, Caroline J Formstone, Stuart Townsend, Andy Greenfield, Lee A Niswander, and Charlotte H Dean. The PCP genes Celsr1 and Vangl2 are required for normal lung branching morphogenesis. *Human Molecular Genetics*, Vol. 19, No. 11, pp. 2251–2267, 2010.
- 52) Florence Tatin, Andrea Taddei, Anne Weston, Elaine Fuchs, Danelle Devenport, Fadel Tissir, and Taija Makinen. Planar cell polarity protein Celsr1 regulates endothelial adherens junctions and directed cell rearrangements during valve morphogenesis. *Developmental Cell*, 2013.
- 53) C. A. Stewart and R. R. Behringer. Mouse oviduct development. *Results and Problems in Cell Differentiation*, Vol. 55, pp. 247–62, 2012.
- 54) Roberts Rugh. *The Mouse its reproduction and development*. Oxford University Press, New York, USA, 1990.
- 55) S. A. Halbert, P. Y. Tam, and R. J. Blandau. Egg transport in the rabbit oviduct: the roles of cilia and muscle. *Science*, Vol. 191, No. 4231, pp. 1052–3, 1976.

- 56) S. A. Halbert, D. R. Becker, and S. E. Szal. Ovum transport in the rat oviductal ampulla in the absence of muscle contractility. *Biology of Reproduction*, Vol. 40, No. 6, pp. 1131–1136, 1989.
- 57) B. A. Afzelius, P. Camner, and B. Mossberg. On the function of cilia in the female reproductive tract. *Fertility and Sterility*, Vol. 29, No. 1, pp. 72–74, 1978.
- 58) G. Bleau, C. L. Richer, and D. Bousquet. Absence of dynein arms in cilia of endocervical cells in a fertile woman. *Fertility and Sterility*, Vol. 30, No. 3, pp. 362–363, 1978.
- 59) Erik Agduhr. Studies on the structure and development of the bursa ovarica and the tuba uterina in the mouse. *Acta Zoologica*, Vol. 8, No. 1, pp. 1–133, 1927.
- 60) M. R. Bakst. Structure of the avian oviduct with emphasis on sperm storage in poultry. *Journal of Experimental Zoology*, Vol. 282, No. 4-5, pp. 618–626, 1998.
- 61) M. H. Wake and R. Dickie. Oviduct structure and function and reproductive modes in amphibians. *Journal of Experimental Zoology*, Vol. 282, No. 4-5, pp. 477–506, 1998.
- 62) H. Yamanouchi, T. Umezu, and Y. Tomooka. Reconstruction of oviduct and demonstration of epithelial fate determination in mice. *Biology of Reproduction*, Vol. 82, No. 3, pp. 528–533, 2010.
- 63) Charlotte L. Ownby. Oklahoma State University College of Veterinary Medicine Curriculum Materials. <http://instruction.cvhs.okstate.edu/histology/HistologyReference/HRFemaleRSframe.htm>, 2002. Female Reproductive System.
- 64) Grant D. Orvis and Richard R. Behringer. Cellular mechanisms of Müllerian duct formation in the mouse. *Developmental Biology*, Vol. 306, No. 2, pp. 493–504, 2007.
- 65) Takeshi Kurita, Paul S. Cooke, and Gerald R. Cunha. Epithelial–stromal tissue interaction in paramesonephric (Müllerian) epithelial differentiation. *Developmental Biology*, Vol. 240, No. 1, pp. 194–211, 2001.
- 66) Hugh S. Taylor, G. B. Vanden Heuvel, and Peter Igarashi. A conserved hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the hoxa cluster genes. *Biology of Reproduction*, Vol. 57, No. 6, pp. 1338–1345, 1997.
- 67) Dongbo Shi, Kouji Komatsu, Mayumi Hirao, Yayoi Toyooka, Hiroshi Koyama, Fadel Tissir, André M. Goffinet, Tadashi Uemura, and Toshihiko Fujimori. Celsr1 is required for the formation of multilevel polarities in mouse oviduct. *Development*, in press, 2014.
- 68) R. A. Lyons, E. Saridogan, and O. Djahanbakhch. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Human Reproduction Update*, Vol. 12, No. 4, pp. 363–372, 2006.

- 69) J. R. Kennedy and K. E. Duckett. The study of ciliary frequencies with an optical spectrum analysis system. *Experimental Cell Research*, Vol. 135, No. 1, pp. 147–156, 1981.
- 70) T. Dalhamn and R. Rylander. Frequency of ciliary beat measured with a photo-sensitive cell. *Nature*, Vol. 196, pp. 592–593, 1962.
- 71) G. Nasr, D. Schoevaert, F. Marano, and J. J. Venant, A. Shirayoshi1986and Legrand. Progress in the measurement of ciliary beat frequency by automated image-analysis - application to mammalian tracheal epithelium. *Analytical Cellular Pathology*, Vol. 9, No. 3, pp. 165–177, 1995.
- 72) W. J. Yi, K. S. Park, Y. G. Min, and M. W. Sung. Distribution mapping of ciliary beat frequencies of respiratory epithelium cells using image processing. *Medical & Biological Engineering & Computing*, Vol. 35, No. 6, pp. 595–599, 1997.
- 73) G. Mantovani, M. Pifferi, and G. Vozzi. Automated software for analysis of ciliary beat frequency and metachronal wave orientation in primary ciliary dyskinesia. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, Vol. 267, No. 6, pp. 897–902, 2010.
- 74) S. Romet, D. Schoevaert, and F. Marano. Dynamic image analysis applied to the study of ciliary beat on cultured ciliated epithelial cells from rabbit trachea. *Biology of the Cell*, Vol. 71, No. 1-2, pp. 183–190, 1991.
- 75) C. Clary-Meinesz, J. Mouroux, P. Huitorel, J. Cosson, D. Schoevaert, and B. Blaive. Ciliary beat frequency in human bronchi and bronchioles. *Chest*, Vol. 111, No. 3, pp. 692–697, 1997.
- 76) H. Teichtahl, P. L. Wright, and R. L. Kirsner. Measurement of in vitro ciliary beat frequency: a television-video modification of the transmitted light technique. *Medical & Biological Engineering & Computing*, Vol. 24, No. 2, pp. 193–196, 1986.
- 77) L. Weström, P. A. Mårdh, C. V. Mecklenburg, and C. H. Håkansson. Studies on ciliated epithelia of the human genital tract. II. The mucociliary wave pattern of fallopian tube epithelium. *Fertility and Sterility*, Vol. 28, No. 9, pp. 955–961, 1977.
- 78) Y. Paltieli, A. Weichselbaum, N. Hoffman, I. Eibschitz, and Z. Kam. Laser scattering instrument for real time in-vivo measurement of ciliary activity in human fallopian tubes. *Hum Reproduction*, Vol. 10, No. 7, pp. 1638–1641, 1995.
- 79) 山岡成章. ヒト卵管の線毛運動に関する研究 (Cilium Movement of Human Oviduct). 日本産科婦人科学会雑誌, Vol. 39, No. 5, pp. 777–784, 1987.
- 80) U. Borell, O. Nilsson, and A. Westman. Ciliary activity in the rabbit fallopian tube during oestrus and after copulation. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, Vol. 36, No. 1, pp. 22–28, 1957.



- 81) F. N. Critoph and K. J. Dennis. Ciliary activity in the human oviduct. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, Vol. 84, No. 3, pp. 216–218, 1977.
- 82) R. A. Lyons, O. Djahanbakhch, T. Mahmood, E. Saridogan, S. Sattar, M. T. Sheaff, A. A. Naftalin, and R. Chenoy. Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. *Human Reproduction*, Vol. 17, No. 3, pp. 584–588, 2002.
- 83) S. Kölle, S. Dubielzig, S. Reese, A. Wehrend, P. König, and W. Kummer. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biology of Reproduction*, Vol. 81, No. 2, pp. 267–274, 2009.
- 84) P. Verdugo.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent hormonal stimulation of ciliary activity. *Nature*, Vol. 283, No. 5749, pp. 764–765, 1980.
- 85) B. Guirao and J. F. Joanny. Spontaneous creation of macroscopic flow and metachronal waves in an array of cilia. *Biophysical Journal*, Vol. 92, No. 6, pp. 1900–1917, 2007.
- 86) A. Bylander, M. Nutu, R. Wellander, M. Goksor, H. Billig, and D. G. Larsson. Rapid effects of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube. *Reproductive Biology and Endocrinology*, Vol. 8, p. 48, 2010.
- 87) A. Nishimura, K. Sakuma, C. Shimamoto, S. Ito, T. Nakano, E. Daikoku, M. Ohmichi, T. Ushiroyama, M. Ueki, H. Kuwabara, H. Mori, and T. Nakahari. Ciliary beat frequency controlled by oestradiol and progesterone during ovarian cycle in guinea-pig Fallopian tube. *Experimental Physiology*, Vol. 95, No. 7, pp. 819–828, 2010.
- 88) Benoit Aigouy, Reza Farhadifar, Douglas B. Staple, Andreas Sagner, Jens-Christian Roeper, Frank Juelicher, and Suzanne Eaton. Cell flow reorients the axis of planar polarity in the wing epithelium of *Drosophila*. *Cell*, Vol. 142, No. 5, pp. 773–786, 2010.
- 89) K. Kunitomo, Y. Yamazaki, T. Nishida, K. Shinohara, H. Ishikawa, T. Hasegawa, T. Okanoue, H. Hamada, T. Noda, A. Tamura, and S. Tsukita. Coordinated ciliary beating requires Odf2-mediated polarization of basal bodies via basal feet. *Cell*, Vol. 148, No. 1-2, pp. 189–200, 2012.
- 90) M. E. Werner, P. Hwang, F. Huisman, P. Taborek, C. C. Yu, and B. J. Mitchell. Actin and microtubules drive differential aspects of planar cell polarity in multiciliated cells. *Journal of Cell Biology*, Vol. 195, No. 1, pp. 19–26, 2011.
- 91) Dianne Fristrom. The cellular basis of epithelial morphogenesis. a review. *Tissue & Cell*, Vol. 20, No. 5, pp. 645–690, 1988.

- 92) M. L. Condic, D. Fristrom, and J. W. Fristrom. Apical cell shape changes during drosophila imaginal leg disc elongation: a novel morphogenetic mechanism. *Development*, Vol. 111, pp. 23–33, 1991.
- 93) Kiichiro Taniguchi, Reo Maeda, Tadashi Ando, Takashi Okumura, Naotaka Nakazawa, Ryo Hatori, Mitsutoshi Nakamura, Shunya Hozumi, Hiroo Fujiwara, and Kenji Matsuno. Chirality in planar cell shape contributes to left-right asymmetric epithelial morphogenesis. *Science*, Vol. 333, No. 6040, pp. 339–341, 2011.
- 94) Yu-Chiun Wang, Zia Khan, Matthias Kaschube, and Eric F Wieschaus. Differential positioning of adherens junctions is associated with initiation of epithelial folding. *Nature*, Vol. 484, No. 7394, pp. 390–393, 2012.
- 95) Kevin S. Nelson, Zia Khan, Imre Molnár, József Mihály, Matthias Kaschube, and Greg J. Beitel. Drosophila Src regulates anisotropic apical surface growth to control epithelial tube size. *Nature Cell Biology*, Vol. 14, No. 5, pp. 518–525, 2012.
- 96) Floris Bosveld, Isabelle Bonnet, Boris Guirao, Sham Tlili, Zhimin Wang, Ambre Petitalot, Raphaël Marchand, Pierre-Luc Bardet, Philippe Marcq, François Graner, and Yohanns Bellaïche. Mechanical control of morphogenesis by Fat/Dachsous/Four-jointed planar cell polarity pathway. *Science*, Vol. 336, No. 6082, pp. 724–727, 2012.
- 97) J. Taylor, N. Abramova, J. Charlton, and P. N. Adler. Van Gogh: a new Drosophila tissue polarity gene. *Genetics*, Vol. 150, No. 1, pp. 199–210, 1998.
- 98) C. R. Vinson and P. N. Adler. Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of Drosophila. *Nature*, Vol. 329, No. 6139, pp. 549–551, 1987.
- 99) T. Nishimura, H. Honda, and M. Takeichi. Planar cell polarity links axes of spatial dynamics in neural-tube closure. *Cell*, Vol. 149, No. 5, pp. 1084–1097, 2012.
- 100) A. E. Shyer, T. Tallinen, N. L. Nerurkar, Z. Wei, E. S. Gil, D. L. Kaplan, C. J. Tabin, and L. Mahadevan. Villification: how the gut gets its villi. *Science*, Vol. 342, No. 6155, pp. 212–8, 2013.
- 101) Jing Yu, Thomas J. Carroll, Jay Rajagopal, Akio Kobayashi, Qun Ren, and Andrew P. McMahon. A Wnt7b-dependent pathway regulates the orientation of epithelial cell division and establishes the cortico-medullary axis of the mammalian kidney. *Development*, Vol. 136, No. 1, pp. 161–71, 2009.
- 102) Y. Kurotaki, K. Hatta, K. Nakao, Y. Nabeshima, and T. Fujimori. Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. *Science*, Vol. 316, No. 5825, pp. 719–723, 2007.

- 103) H. Kiyonari, M. Kaneko, S. Abe, and S. Aizawa. Three inhibitors of FGF Receptor, ERK, and GSK3 establishes germline-competent embryonic stem cells of C57BL/6N mouse strain with high efficiency and stability. *Genesis*, Vol. 48, No. 5, pp. 317–327, 2010.
- 104) J. Nichols, K. Jones, J. M. Phillips, S. A. Newland, M. Roode, W. Mansfield, A. Smith, and A. Cooke. Validated germline-competent embryonic stem cell lines from nonobese diabetic mice. *Nature Medicine*, Vol. 15, No. 7, pp. 814–818, 2009.
- 105) Q. L. Ying, J. Wray, J. Nichols, L. Battle-Morera, B. Doble, J. Woodgett, P. Cohen, and A. Smith. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, Vol. 453, No. 7194, pp. 519–523, 2008.
- 106) Richard Behringer, Marina Gertsenstein, Kristina Vintersten Nagy, and Andras Nagy. *Manipulating the mouse embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 4th edition, 2014.
- 107) P. Thévenaz, U. E. Ruttimann, and M. Unser. A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Transactions on Image Processing*, Vol. 7, No. 1, pp. 27–41, 1998.
- 108) T. Hanaichi, T. Sato, T. Iwamoto, J. Malavasi-Yamashiro, M. Hoshino, and N. Mizuno. A stable lead by modification of Sato’s method. *Journal of Electron Microscopy*, Vol. 35, No. 3, pp. 304–6, 1986.
- 109) Jerrold H. Zar. *Biostatistical Analysis*. Pearson Education International, 5th edition, 2010.
- 110) M. Montcouquiol, N. Sans, D. Huss, J. Kach, J. D. Dickman, A. Forge, R. A. Rachel, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, D. Bogani, J. Murdoch, M. E. Warchol, R. J. Wenthold, and M. W. Kelley. Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *Journal of Neuroscience*, Vol. 26, No. 19, pp. 5265–5275, 2006.
- 111) E. Torban, A. M. Patenaude, S. Leclerc, S. Rakowiecki, S. Gauthier, G. Andelfinger, D. J. Epstein, and P. Gros. Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 105, No. 9, pp. 3449–3454, 2008.
- 112) M. Kusaka, Y. Katoh-Fukui, H. Ogawa, K. Miyabayashi, T. Baba, Y. Shima, N. Sugiyama, Y. Sugimoto, Y. Okuno, R. Kodama, A. Iizuka-Kogo, T. Senda, T. Sasaoka, K. Kitamura, S. Aizawa, and K. Morohashi. Abnormal epithelial cell polarity and ectopic epidermal growth factor receptor (EGFR) expression induced in Emx2 ko embryonic gonads. *Endocrinology*, Vol. 151, No. 12, pp. 5893–5904, 2010.
- 113) A. Untergasser, H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, and J. A. Leunissen. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, No. Web Server issue, pp. W71–W74, 2007.

## 謝辞

本研究は京都大学生命科学研究科 上村 匡教授と基礎生物学研究所 藤森 俊彦教授の指導の下、主に自然科学研究機構基礎生物学研究所初期発生部門で約6年半にわたって行われました。強烈に个性的で、しかも結構意見の異なる両教授に囲まれるという素晴らしい多様な環境の中で、のびのびと、しかし真剣に科学と向かい合うことが出来ました。この期間は、一人の人間が成長していく上でも、とても大事な経験でした。特に藤森教授には科学の基礎を、足取り手取り教えていただきました。感謝の念を表すと共に、弟子第一号という自負を持って、これからもがんばっていきたいと思います。

また、本研究は小松 紘司博士と共同で行われた研究です。私一人では決してたどり着けないような幅の広い研究にすることができ、そのおかげで生物に対する理解をより深めることが出来たと思います。実験作法の基礎も教えていただき、共に研究出来た期間は、私にとって大変楽しいものでした。実験や論文への助言に加え、未発表データも含むデータの提供も快諾してくださり、ありがとうございました。

研究を行うに当たって、多くの方より貴重な材料を分与・提供していただきました。本文中にも記しましたが、Dr. Elaine Fuchs (抗体等)、Dr. Mireille Montcouquiol (抗体)、Dr. Fadel Tissir & Dr. André Goffinet (*Celsr1* 変異マウス) に改めて謝意を表します。

平尾 真由美さんには画像解析を、高瀬 弘嗣さんには電子顕微鏡観察を、藤森 俊彦博士にはキメラマウス作出を行っていただきました。また、実験手法について助言をいただきました、土居 智和博士、塚田 祐基博士をはじめとする定量生物学の会で出会った方々(画像解析)、豊岡 やよい博士 (ES細胞培養) にも謝意を表します。

基礎生物学研究所 モデル動物研究支援室の方々の支援の下、マウスの飼育・管理が行われました。また、基礎生物学研究所生物機能情報分析室、光学解析室の共通機器、生殖細胞研究部門 (吉田 松生教授) の所有する機器を実験に使わせていただきました。このような環境に恵まれたことを、有り難く感じております。

論文執筆に当たり、佐々木 洋博士、新田 昌輝さん、宇佐美 文子さんに助言をいただきました。また、初期発生研究部門の方々、細胞認識学分野の方々とは、日頃より様々な議論をさせていただき、多くのことを学ばせていただきました。加藤あづささん、沖かなえさん、水越絢子さん、清水久美子さんには、事務手続きなどでお世話になりました。新田 昌輝さんや、大原 裕也博士などの良友、悪友にも恵まれ、充実した大学院生活を送ることが出来ました。鈴木 (石) 久美子さんには、晴れの日も雨の日も寄り添っていただき、刺激的な毎日を送ることができました。ここに記しきれませんが、基礎生物学研究所の方々や、京都大学大学院生命科学研究科の方々、日本発生生物学会の方々など、他にも多くの人に支えられて、本研究を行うことが出来ました。みなさんに感謝すると共に、この6年半で得たかけがえのない経験を胸に、これからも精進していきたいと思います。

なお、本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものです。

Dongbo Shi, Kouji Komatsu, Tadashi Uemura and Toshihiko Fujimori  
Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in the mouse oviduct  
*Genes to Cells* 16(3) 282–290, 2011

Dongbo Shi, Kouji Komatsu, Mayumi Hirao, Yayoi Toyooka, Hiroshi Koyama, Fadel Tissir,  
André M Goffinet, Tadashi Uemura and Toshihiko Fujimori  
Celsr1 is required for the generation of polarity at multiple levels of the mouse oviduct  
*Development*, in press, 2014

また、日本学術振興会特別研究員 (DC1) として本研究に従事することができました。日本学術振興会の支援に感謝します。

平成 26 年 9 月 16 日

石 東博